

MARIA CECÍLIA CLOSS ONO

**INFLUÊNCIA DE DIETA IMUNOMODULADORA
NA CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA EM RATOS**

CURITIBA

2009

MARIA CECÍLIA CLOSS ONO

**INFLUÊNCIA DE DIETA IMUNOMODULADORA
NA CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau acadêmico de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos

Co-orientador: Prof. Dr. Renato da Silva Freitas

Coordenador: Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos

CURITIBA

2009

Ono, Maria Cecília Closs

Influência de dieta imunomoduladora na cicatrização cutânea em ratos / Maria Cecília Closs Ono. Curitiba, 2009.
125 f. : il. ? ; 30 cm.

Orientador: Antônio Carlos Ligocki Campos

Co-orientador: Renato da Silva Freitas

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica. Área de Concentração: Clínica Cirúrgica. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Cicatrização de pele. 2. Imunonutrição. 3. Experimental.
Título. II. Campos, Antônio Carlos Ligocki.

NLM WF 100

À Deus, pelas oportunidades e dádiva da família,
Ao meu marido pelo amor eterno e apoio incessantes,
Aos meus pais pela orientação e cuidados constantes.

“Até aqui nos ajudou o Senhor.” (I Samuel 7.12)

AGRADECIMENTOS

A elaboração deste trabalho só se tornou possível devido à colaboração de inúmeras pessoas. Nomear a todos seria impossível. No entanto, gostaria de registrar aquelas pessoas e/ou instituições que estiveram mais diretamente vinculadas à realização desta dissertação, aos quais agradeço:

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos L. Campos, Professor Titular do Departamento de

Cirurgia, orientador desta dissertação, pela confiança, constante incentivo, dedicação e auxílio; contribuindo de forma essencial desde a primeira idéia até a concretização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Renato da Silva Freitas, co-orientador deste trabalho e incentivador da minha carreira acadêmica.

Aos amigos e colegas Alessandra Borges, Luciano Okawa e Nicolas Ahumada pelas contribuições em várias fases deste trabalho.

À Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de realizar meus cursos

de graduação e de pós-graduação.

À CAPES pelo incentivo à pesquisa em nosso país.

RESUMO

Introdução: uma das principais funções da pele é servir como barreira mecânica ao meio externo. A perda em grandes proporções da sua integridade pode levar a importantes alterações da homeostase ou mesmo à morte do indivíduo. O processo de cicatrização constitui resposta imediata e dinâmica do organismo à lesão tecidual com o objetivo de restaurar a continuidade anatômica e funcional. Para que a ótima cicatrização ocorra, deve existir um conjunto de condições, o que inclui um estado nutricional adequado. Dentre as fórmulas de suplementação existente aparecem as imunomoduladoras. Estas têm sido implicadas na melhora do processo cicatricial e das condições clínicas dos pacientes tratados. O presente trabalho avaliou a influência da dieta imunomoduladora em sua forma comercial (Impact®) sobre diferentes variáveis do processo de cicatrização cutânea. **Método:** ratos machos, adultos e nutridos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos a serem suplementados, por meio de gavagem, com a dieta em estudo e com a dieta controle. Dois grupos receberam as respectivas dietas apenas pre-operatoriamente e os outros dois grupos as receberam no perioperatório. Os ratos foram submetidos a três tipos de lesões cutâneas – feridas excisionais dorsais, feridas menores dorsais para análise da reepitelização cutânea e feridas incisionais ventrais. Foram analisados os seguintes parâmetros: evolução dos pesos, evolução das áreas cruentas das feridas excisionais dorsais, tensiometria das feridas incisionais, taxas de reepitelização, contagem diferencial de células do tecido de granulação e análise do colágeno. **Resultados:** os grupos não tiveram diferença quanto à evolução dos pesos. A análise das áreas das feridas excisionais dorsais mostrou melhores índices de fechamento nos grupos suplementados com Impact® a partir do 5º dia de pós-operatório ($p=0.02$). Os grupos suplementados com a dieta em estudo também obtiveram melhores resultados no que concerne à tensiometria (variáveis tensão e força máxima com $p = 0,03$), taxas de reepitelização ($0,04$), contagem diferencial de células ($p<0,001$) e quantidade de colágeno total ($p<0,001$). Não houve diferença entre os grupos quanto à diferenciação dos colágenos maduro e imaturo ($p>0,05$). **Conclusões:** a dieta em estudo (Impact®) é capaz de promover melhores taxas de fechamento de feridas cruentas, levar a uma reepitelização mais rápida, cicatrizes com maior resistência tênsil e maiores quantidades de colágeno total nas feridas. Não houve diferença em nenhum dos parâmetros analisados no que concerne à comparação dos grupos suplementados com Impact® pré e perioperatoriamente.

Palavras-chave: cicatrização de pele; imunonutrição; experimental.

ABSTRACT

Introduction: one of the most important roles of the skin is to act as a barrier. In cases when this barrier is lost, homeostasis is also interrupted and death is a possible consequence. Wound healing constitutes an immediate and dynamic process that targets the reestablishment of continuity of the tissue. In order to achieve an adequate wound healing various different conditions are required, specially a normal nutritional state. Nowadays lots of formulas have been proposed to restore the nutritional condition. Among them we have the immunomodulators dietary, that has been implicated in the enhancement of various different wound healing components. The present study has analyzed the influence of the immunomodulator diet commercially called Impact® on various skin wound healing steps. Method: male, adult and nourished rats has been divided into four different groups. These groups received Impact® or a control diet, pre or perioperatively. The rats underwent three different skin lesions (excisional dorsally, smaller dorsal excisional wounds for reepithelization analysis and an incisional ventral wound). We analyzed the weight during all the periods of the experiment and other parameters as: the area of the excisional dorsal wounds, reepithelization, cellular differential count into the granulation tissue, tensile resistance of the incisional wound and the amount of collagen. Results: there has been no difference between the weights of the animals into the four groups. The groups that received Impact® had faster closure of the dorsal excisional wounds and reepithelization, and a greater tensile resistance and total collagen deposition. There has been no difference between the collagen differentiation into the four groups. Conclusions: the diet Impact® has been capable of promote faster closure and reepithelization of the wounds, better tensile resistance and a greater amount of total collagen deposition. There has been no difference between any parameters when the two groups that received Impact® (pre and perioperatively) were compared.

Key-words: wound healing; immunonutrition; experimental.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - FASES DA CICATRIZAÇÃO	17
FIGURA 2 - INDUÇÃO DA HEMOSTASIA IMEDIATAMENTE APÓS O TRAUMA	18
FIGURA 3 - INFLUXO DE NEUTRÓFILOS NA FERIDA, NAS PRIMEIRAS 24H	20
FIGURA 4 - PREDOMINÂNCIA DE MACRÓFAGOS	21
FIGURA 5 - ATIVAÇÃO DOS FIBROBLASTOS	25
FIGURA 6 - GAVAGEM	67
FIGURA 7 - ESQUEMA DE MARCAÇÃO DOS ANIMAIS	64
FIGURA 8 - MÉTODO DE MARCAÇÃO DAS FERIDAS EXCISIONAIS E INCISIONAL	70
FIGURA 9 - ESQUEMA DOS PROCEDIMENTOS OPERATÓRIOS	71
FIGURA 10 - MÉTODO DE CONTROLE FOTOGRÁFICO	72
FIGURA 11 - TESTE TENSOMÉTRICO	73
FIGURA 12 - ANÁLISE EVOLUTIVA DA CONTRAÇÃO CICATRICIAL	75
FIGURA 13 - MÉTODO DE CALIBRAGEM DAS IMAGENS	76
FIGURA 14 - MÉTODO DE CÁLCULO DAS IMAGENS	77
FIGURA 15 - FERIDA EXCISIONAL. FASES DO PROCESSO CICATRICIAL	79
FIGURA 16 - COLORAÇÃO COM PICROSIRIUS RED F3-BA	81
FIGURA 17 - MÉTODO DE AFERIÇÃO DAS QUANTIDADES DE COLÁGENO I E III	81
FIGURA 18 - EXEMPLOS DA CONTAGEM CELULAR	93

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - EVOLUÇÃO DOS PESOS.....	84
GRÁFICO 2 - EVOLUÇÃO DAS ÁREAS CRUENTAS NOS GRUPOS PI, PC, PPI E PPC.....	85
GRÁFICO 3 - EVOLUÇÃO DAS ÁREAS CRUENTAS NOS GRUPOS PI E PPI.....	86
GRÁFICO 4 - TAXA DE CONTRAÇÃO NOS GRUPOS PI, PC, PPI E PPC	87
GRÁFICO 5 - TAXA DE CONTRAÇÃO NOS GRUPOS PI E PPI	87
GRÁFICO 6 - AVALIAÇÃO TENSIO MÉTRICA -TENSÃO MÁXIMA NOS GRUPOS PI, PC, PPI E PPC.....	88
GRÁFICO 7 - AVALIAÇÃO TENSIO MÉTRICA -TENSÃO MÁXIMA NOS GRUPOS PI E PPI.....	89
GRÁFICO 8 - AVALIAÇÃO TENSIO MÉTRICA -FORÇA MÁXIMA NOS GRUPOS PI, PC, PPI E PPC.....	90
GRÁFICO 9 - AVALIAÇÃO TENSIO MÉTRICA -FORÇA MÁXIMA NOS GRUPOS PI E PPI.....	90
GRÁFICO 10 - AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE REEPITELIZAÇÃO	91
GRÁFICO 11 - AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DE FIBROBLASTOS	92
GRÁFICO 12 - AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE TOTAL DE COLÁGENO FERIDAS EXCISIONAIS	94
GRÁFICO 13 - AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE TOTAL DE COLÁGENO FERIDAS INCISIONAIS.....	95
GRÁFICO 14 - AVALIAÇÃO DAS QUANTIDADES DE COLÁGENO MADURO E IMATURO DAS FERIDAS EXCISIONAIS.....	96
GRÁFICO 15 - AVALIAÇÃO DAS QUANTIDADES DE COLÁGENO MADURO E IMATURO DAS FERIDAS INCISIONAIS.....	97

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - FASE INFLAMATÓRIA DA CICATRIZAÇÃO	19
QUADRO 2 - FATORES DE CRESCIMENTO	22
QUADRO 3 - FASE PROLIFERATIVA DA CICATRIZAÇÃO.....	27
QUADRO 4 - FASE DE REMODELAMENTO DA CICATRIZAÇÃO	35
QUADRO 5 - COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO NUVILAB®	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO DA DIETA ENTERAL IMPACT® E DIETA CONTROLE.....	63
TABELA 2 - COMPARAÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS	84
TABELA 3 - VALORES DAS QUANTIDADES DE COLÁGENO MADURO E IMATURO.....	95
TABELA 4 - RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS	98

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
µg	Micrograma
+	Positivo
++	Fortemente Positivo
=	Igual
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
cm	Centímetro
dp	Desvio Padrão
<i>et al</i>	E outros
UFPR	Universidade Federal do Paraná
g	Gramma
h	Horas
HE	Hematoxilina Eosina
Kcal	Quilocaloria
Kg	Quilograma
mg	Miligrama
°C	Graus Celsius
RNA	Ácido Ribonucleico
EP	Erro Padrão
Kgf	Quilograma-Força
vs	Versus
®	Marca Registrada
±	Mais ou Menos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVOS	17
1.4.1 Objetivo Principal	17
1.4.2 Objetivos Secundários	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA	18
2.1.1 Fase Inflamatória	19
2.1.2 Fase Proliferativa	25
2.1.2.1 Reepitelização	29
2.1.2.2 Restauração da Membrana Basal	31
2.1.2.3 Reconstituição da Derme	32
2.1.2.3 Angiogênese	32
2.1.2.3 Contração da Ferida	33
2.1.3 Fase de Remodelamento	35
2.2 IMPORTÂNCIA DO COLÁGENO	38
2.3 FATORES QUE INFLUENCIAM A CICATRIZAÇÃO	39
2.3.1. Fatores Locais	39
2.3.2 Fatores Sistêmicos	39
2.4 MODELOS EXPERIMENTAIS DE CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA	40
2.4.1 Animais e Técnica Cirúrgica	40
2.4.2 Tensiometria	44
2.4.3 Avaliação da Contração da Ferida	46
2.4.4 Análise Histológica e Densitometria do Colágeno	46
2.4.5. Imunoistoquímica	48
2.4.6 Fatores de Crescimento	49
2.5 NUTRIÇÃO E CICATRIZAÇÃO	50
2.5.1 Imunonutrição	52
3. METODOLOGIA	63
3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	63
3.2 ANIMAIS E ALIMENTAÇÃO	63
3.3 DIETAS ENTERAIS PARA SUPLEMENTAÇÃO	64
3.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	66
3.4.1 Grupos de Pesquisa	66
3.4.2 Desenho da Pesquisa	67
3.5 CONTROLE DE PESO	68

3.6 GAVAGEM	68
3.7 ANESTESIA	69
3.8 PROCEDIMENTOS OPERATÓRIOS.....	70
3.9 CONTROLE FOTOGRÁFICO	74
3.10 TESTE TENSIO MÉTRICO	75
3.11 AVALIAÇÃO DA CONTRAÇÃO CICATRICIAL	76
3.12 ANÁLISE MICROSCÓPICA	79
3.12.1 Coloração pela Hematoxilina-Eosina (HE).....	79
3.12.1 Coloração pelo Picrosirius, para Análise Quali e Quantitativa do Colágeno	81
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	83
4. RESULTADOS.....	85
4.1 ANÁLISE DAS DIETAS E DA INGESTÃO DE ARGININA E IMUNONUTRIENTES.....	85
4.2 PESO	85
4.3 MORBIDADE E MORTALIDADE.....	86
4.4 AVALIAÇÃO DA CONTRAÇÃO CICATRICIAL	87
4.5 AVALIAÇÃO TENSIO MÉTRICA.....	90
4.5.1 Tensão Máxima	90
4.5.2 Força Máxima	91
4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	93
4.6.1 Avaliação Microscópica da Reepitelização	93
4.6.2 Avaliação Microscópica Relacionada à Derme	94
4.6.3 Quantificação do Colágeno Total.....	95
4.6.4 Qualificação do Colágeno.....	97
4.7 RESUMO DOS RESULTADOS.....	100
5. DISCUSSÃO	101
5.1 DOS MÉTODOS.....	101
5.2 DOS RESULTADOS	103
5.3 DOS EFEITOS DAS DIETAS SOBRE A CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA.	105
5.4 PERSPECTIVAS	106
6. CONCLUSÕES	108
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
8. ANEXOS.....	113

1. INTRODUÇÃO

A cicatrização cutânea é um processo dinâmico que envolve uma rede complexa de interações extracelulares, mediadores químicos e células locais e inflamatórias (SINGER, CLARK, 1999). Este processo tem como objetivos principais a restauração da integridade tissular e manutenção da homeostasia (EMING *et al.*, 2007).

O processo de cicatrização envolve três fases sequenciais que se interrelacionam, ocorrendo de forma dinâmica e sobreposta: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelamento (CLARK, 2005; GURTNER *et al.*, 2008)

Para que ocorra adequada cicatrização, deve existir um conjunto de condições que incluem boa perfusão tecidual, ausência de debris, sistema imunológico e fibroblástico eficientes e, em pacientes cirúrgicos, adequada técnica cirúrgica (MOREIRA, 2000). Além disso, um estado nutricional adequado é fator importante para lograr processo de cicatrização ótimo, pois a dinâmica tecidual exige energia e substratos plásticos provenientes de proteínas e micronutrientes (ROBERTS *et al.*, 1998). A deficiência de proteína, potencialmente presente nas condições de trauma como queimaduras, e cirurgias de grande porte, prejudica o processo de cicatrização, favorecendo maior risco de infecções (GIANOTTI *et al.*, 1995). Fisiologicamente, a depleção protéica no processo cicatricial prolonga a fase inflamatória e prejudica a fibroplasia. Ocorre diminuição da proliferação fibroblástica, angiogênese, produção de colágeno e, conseqüentemente, menor reparo tecidual da ferida (SCHOLL, LANGKAMP-HENKEN, 2001).

Na prática clínica, a oferta de nutrientes pode ocorrer por via oral, enteral e parenteral. Nos últimos anos houve importante desenvolvimento de formulações nutricionais especializadas para atender necessidades particulares de órgãos e sistemas, disponíveis sob a forma de suplementos orais ou formulações para uso por sondas enterais. Dentre elas, encontram-se fórmulas hiperprotéicas, enriquecidas de arginina e nutrientes antioxidantes como zinco, selênio, vitamina C e E, desenhadas para atender

as necessidades decorrentes do processo cicatricial e otimizar o seu desenvolvimento. Estas fórmulas são conhecidas como imunomoduladoras (DESNEVES *ET AL.*, 2005).

A utilização de imunonutrientes em fórmulas enterais tem sido objeto de estudos clínicos e experimentais. Atualmente, a terapia nutricional pretende, ao lado de fornecer energia e substratos nutricionais, influenciar de maneira farmacológica funções orgânicas prejudicadas pelo estado patológico do paciente, particularmente, quando imunossupressão e/ou hiperinflamação estão presentes. Nessas condições, a oferta enteral ou parenteral de nutrientes com funções imunomoduladoras se associam a benefícios como aumento da celularidade e promoção de funções imunológicas (SUCHNER *et al.*, 2000). A melhora do sistema imunológico com a utilização de nutrientes como n-3 ácidos graxos, arginina e nucleotídeos tem sido relacionada à diminuição da incidência de complicações infecciosas, isto especialmente em pacientes submetidos a cirurgias no trato digestivo por câncer e em pacientes vítimas de trauma (DALY *et al.*, 1972; BRAGA *et al.*, 1996; MCCOWEN, BISTRAN, 2003; BOTTONI *et al.*, 2008; WAITZBERG, TORRINHAS, 2009).

Considerando-se que o estado nutricional pode interferir no processo cicatricial e que nutrientes como arginina e alguns minerais e vitaminas com efeitos reconhecidamente antioxidantes podem promover etapas desse processo, torna-se de especial interesse avaliar o real impacto desses nutrientes na cicatrização frente a diferentes condições nutricionais e compreender alguns mecanismos celulares e moleculares envolvidos entre nutrição e cicatrização de feridas. Modelos experimentais são úteis para a pesquisa de cicatrização, pois, resguardando os aspectos éticos, permitem criar em laboratório de investigação condições que se assemelham às encontradas na prática clínica.

Vários estudos experimentais e clínicos já avaliaram os efeitos da suplementação de arginina na cicatrização cutânea, porém ainda não se tem um consenso nem sobre a sua efetividade em melhorar a resposta cicatricial nem sobre os mecanismos de ação possivelmente envolvidos (DEBATS *et al.*, 2009).

O presente trabalho avalia a influência da dieta imunomoduladora em sua forma comercial (Impact®) sobre diferentes variáveis do processo de cicatrização cutânea, incluindo o fechamento de feridas excisionais, a resistência das cicatrizes em feridas incisionais, a reepitelização de feridas cruentas e as diferenciações celulares no tecido cicatricial e da matriz de colágeno neoformada.

1. 1 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo Geral

Verificar a influência da administração pré ou peri operatória de dieta enteral suplementada com arginina e imunonutrientes sobre variáveis envolvidas no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos nutridos.

1.4.2 Objetivos Específicos

Os objetivos secundários consistem em avaliar no tecido de granulação e na ferida incisional cutânea os efeitos da dieta enteral suplementada com arginina e imunonutrientes no que concerne à:

- a) contração da ferida cutânea;
- b) reepitelização de feridas cruentas;
- c) resistência tênsil;
- d) diferenciação celular do infiltrado inflamatório no tecido cicatricial;
- e) quantidade de colágeno total;
- f) diferenciação dos colágenos tipo I e III.

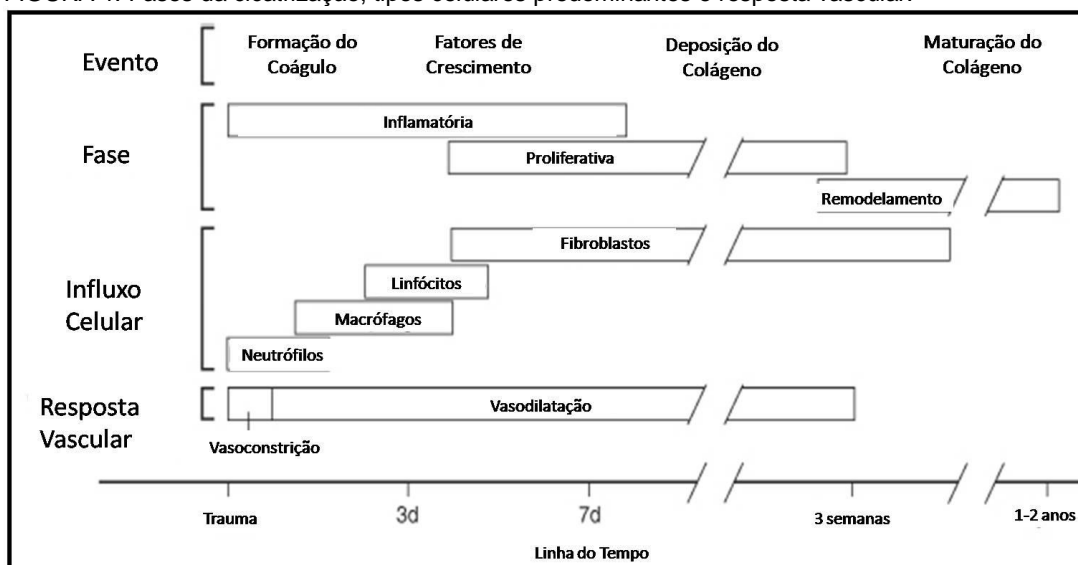
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA

Uma das principais funções da pele é servir como barreira mecânica ao meio externo. A perda em grandes proporções da sua integridade pode levar a importantes alterações da homeostase ou mesmo à morte do indivíduo (EMING *et al.*, 2007). O principal objetivo no tratamento das feridas cutâneas é promover rápida restauração da lesão, com cicatrizes satisfatórias do ponto de vista funcional e estético. Recentes avanços na biologia celular e molecular têm expandido sobremaneira a compreensão do complexo e ordenado processo de cicatrização das feridas (CLARK *et al.*, 2000). Não obstante represente um antigo desafio, a completa compreensão e o controle deste evento indispensável para a sobrevivência humana constitui ainda sonho de muitos. Atualmente, embora o processo de cicatrização cutânea seja mais bem compreendido, ainda falta muito a ser elucidado, o que pode proporcionar novas e melhores formas terapêuticas (SINGER, CLARK, 1999).

O processo de cicatrização constitui resposta imediata e dinâmica do organismo à lesão tecidual com o objetivo de restaurar a continuidade anatômica e funcional (BARBUL, 1990; THORNTON *et al.*, 1997). Sob o ponto de vista histológico, pode ser definido como a substituição do tecido lesado por tecido conjuntivo fibroso que, no seu estado permanente, formará uma cicatriz, com preservação da estrutura e função do tecido normal (DIEGELMANN, 1997). Consiste em processo dinâmico e interativo, que envolve células inflamatórias e do parênquima lesado, complexa cadeia de mediadores solúveis, bem como a matriz extracelular (EFRON *et al.*, 2001; GILLITZER, GOEBELER, 2001; WILGUS, 2008). Apesar dos eventos ocorrerem de forma dinâmica e se sobreporem no tempo, do ponto de vista morfológico é possível classificá-los sequencialmente em três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelamento (WITTE, BARBUL, 1997), como pode ser observado na Figura 1.

FIGURA 1: Fases da cicatrização, tipos celulares predominantes e resposta vascular.



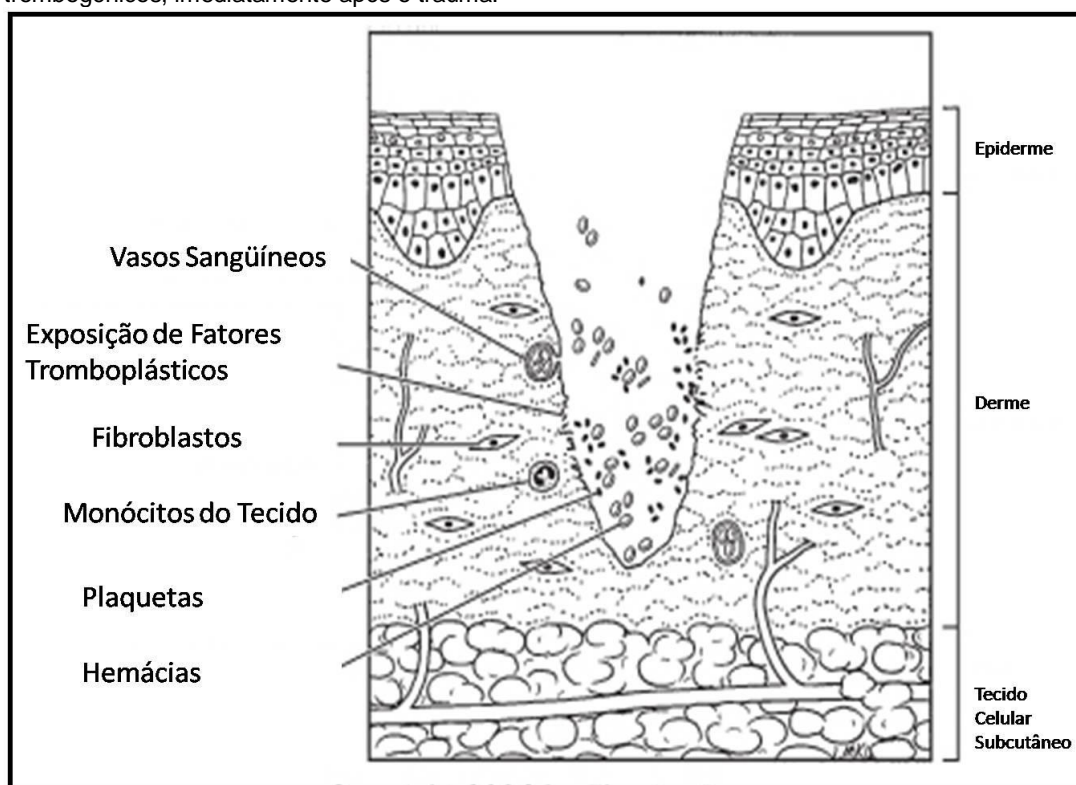
FONTE: MATHES, 2006.

2.1.1 Fase Inflamatória

A fase inflamatória representa a primeira fase de qualquer processo de cicatrização, e caracteriza-se pela participação ativa de inúmeras células e fatores do sistema imunológico (MATHES, HENTZ, 2006). Ela pode ser didaticamente subdividida em resposta vascular e resposta celular. Uma vez que o sangramento ocorre imediatamente após a lesão tecidual, o primeiro evento do processo de cicatrização é a hemostasia, a qual se faz por agregação plaquetária, ativação da cascata de coagulação e formação da rede de fibrina (KIRSNER, EAGLSTEIN, 1993; SINGER, CLARK, 1999). Além do controle do sangramento, o coágulo sanguíneo formado constitui suporte para a intensa migração celular local (FIGURA 2). As plaquetas são as primeiras células a apresentarem-se no sítio da lesão e, além da propriedade hemostática, secretam vários mediadores envolvidos na cicatrização (SZPADERSKA *et al.*, 2003). O fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), dentre outras funções, atrai e ativa macrófagos e fibroblastos no sítio da lesão. Inúmeros mediadores vasoativos e fatores quimiotáticos também são produzidos pela cascata da coagulação, pela ativação do sistema complemento e por células do parênquima lesado,

recrutando também inúmeras células inflamatórias para a ferida (LI *et al.*, 2007). Porém, em 2008 alguns autores cogitaram a hipótese de que as plaquetas não teriam tanta influência na quimiotaxia de neutrófilos (NURDEN *et al.*, 2008).

FIGURA 2: Indução da hemostasia pela degranulação plaquetária e exposição de agentes trombogênicos, imediatamente após o trauma.



FONTE: MATHES, 2006.

A resposta celular na fase inflamatória é caracterizada principalmente pelo influxo de leucócitos na área da lesão. Nas primeiras 24 horas, os neutrófilos constituem as células predominantes na ferida (FIGURA 3). Eles caracterizam a primeira linha de defesa celular, eliminando partículas estranhas e destruindo microorganismos por fagocitose e pela liberação de enzimas (MARTIN, LEIBOVICH, 2005). Posteriormente, o número de neutrófilos diminui e o de monócitos e macrófagos predomina (LI *et al.*, 2007). Entretanto, a diminuição do número de neutrófilos na ferida não parece afetar a quantidade de macrófagos posteriormente (DOVI *et al.*, 2003). Além disso, os mastócitos têm importante papel no recrutamento de neutrófilos nas feridas agudas, mas estudos experimentais mostram que, na sua ausência ocorre diminuição do recrutamento de neutrófilos, porém o

número de macrófagos permanece inalterado (EGOZI *et al.*, 2003; WELLER *et al.*, 2006).

Um resumo dos principais eventos da fase inflamatória pode ser visualizado no Quadro 1 (BAUM, ARPEY, 2005).

QUADRO 1: Fase Inflamatória da Cicatrização.

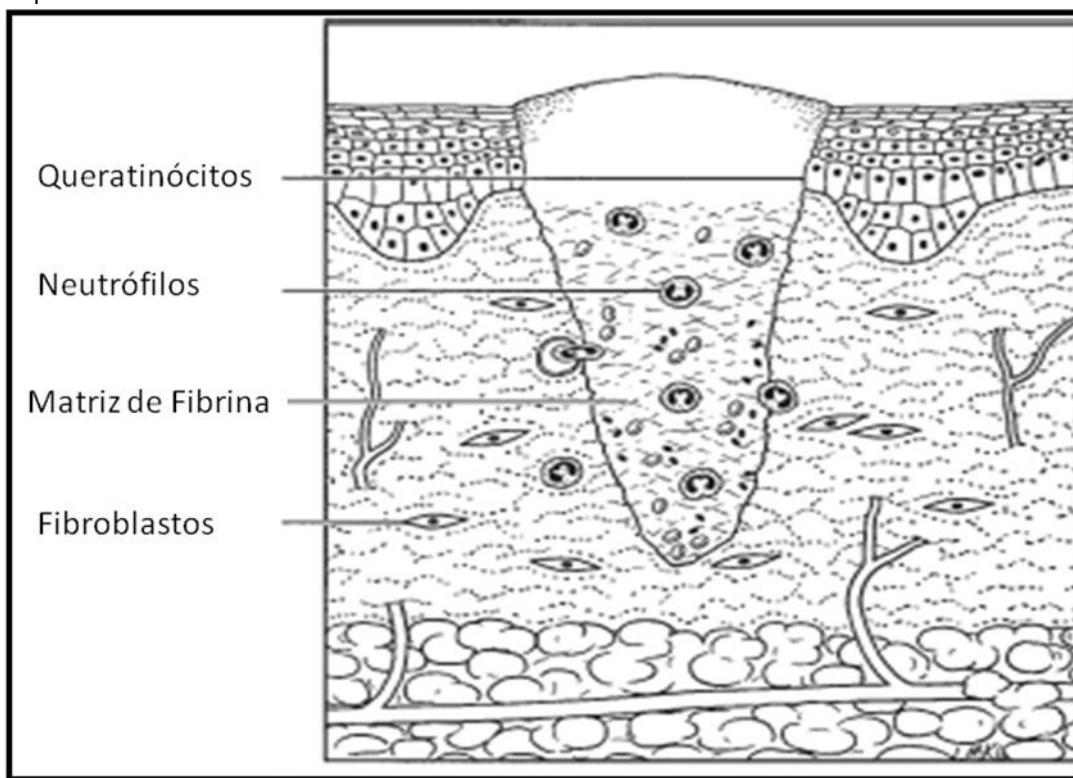
Tempo	Processo	Macroscopia	Células Envolvidas	Componentes Extracelulares Envolvidos	Principais Mediadores
0 a 15 minutos	Hemostasia	Palidez	Células Endoteliais		Adrenalina Prostaglandinas Tromboxanos
		Formação do Coágulo	Plaquetas Células Endoteliais	Fibrina Fibronectina	Trombina
15 minutos até o 6º dia	Inflamação	Edema, Calor, Rubor e Dor	Células Endoteliais Mastócitos Neutrófilos Macrófagos Linfócitos T	Matriz Extracelular “Provisória” (Composta por Fibrina)	Sistema Nervoso Simpático Histamina Quininas Leucotrienos Trombina Proteínas do Complemento PDGF IL-8 TGF- β IL-1 α IL-1 β IL-6 TNF- α

Legenda: IL – Interleucina; PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas; TGF – fator de crescimento transformador; TNF – fator de necrose tumoral.
Adaptado de Baum e Arpey, 2005.

Os macrófagos têm papel fundamental no término do desbridamento iniciado pelos neutrófilos e sua maior contribuição é a secreção de citocinas e fatores de crescimento, além de contribuírem na angiogênese, fibroplasia e síntese de matriz extracelular (BROUGHTON *et al.*, 2006b), fundamentais para a transição para a fase proliferativa. Os neutrófilos e monócitos são recrutados por fatores quimiotáticos liberados durante a fase de hemostasia (calicreína, fibrinopeptídeos derivados do fibrinogênio e produtos de degradação da fibrina) e pelos mastócitos (fator de necrose tumoral, histamina, proteases, leucotrienos e interleucinas) (NOLI, MIOLO, 2001). Fatores de crescimento como PDGF e fator de crescimento transformador β (TGF- β) também são potentes fatores quimiotáticos para leucócitos. Os

receptores de integrina encontrados na superfície das células aumentam a interação célula-matriz extracelular e, por conseguinte, potencializam sua função fagocitária (GILMAN *et al.*, 2002).

FIGURA 3: Influxo de neutrófilos na ferida, nas primeiras 24 horas. Os neutrófilos são os responsáveis pela limpeza dos debris e defesa contra bactérias, além de secretar citocinas que continuarão a resposta inflamatória.



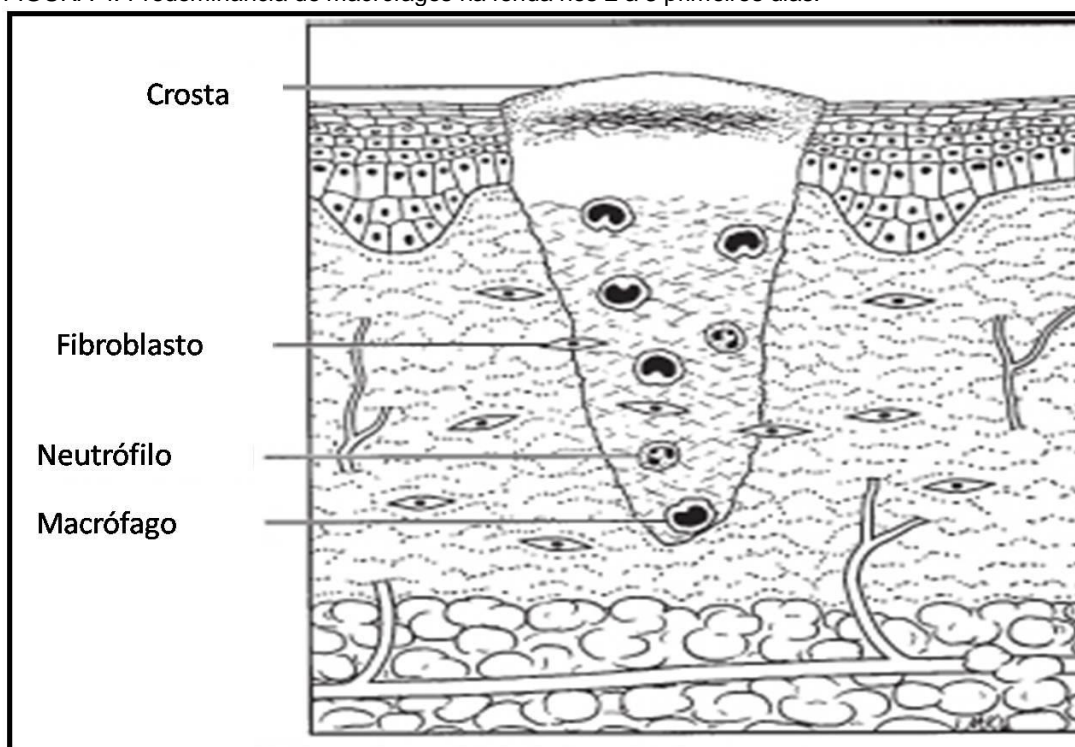
FONTE: MATHES, 2006.

Além desses fatores quimiotáticos, os monócitos são atraídos para o sítio da lesão por substâncias monócito-específicas como a proteína quimioatrativa de monócitos 1 (KUNKEL *et al.*, 1991) e a proteína inflamatória de macrófagos 1 (SHERRY *et al.*, 1988). Produtos de degradação da matriz extracelular, fibronectina e trombina, também são quimiotáticas para os monócitos (POSTLETHWAITE, KANG, 1976). Ao migrarem para a ferida, os monócitos transformam-se em macrófagos ativos, constituindo então as células predominantes na fase inflamatória.

Os macrófagos são considerados as células regulatórias mais importantes do processo cicatricial (FIGURA 4). Animais com depleção de macrófagos demonstram deficiência na reparação tecidual (LEIBOVICH, ROSS, 1975). Por meio dos receptores de integrina, os macrófagos ligam-se a proteínas específicas da matriz extracelular, o que estimula a fagocitose de

microorganismos e de fragmentos da matriz (GILMAN *et al.*, 2002). Eles também produzem uma série de fatores de crescimento, incluindo PDGF, fator de crescimento fibroblástico, fator de crescimento endotelial, TGF- β , TGF- α , e o fator de crescimento *insulin-like* 1 (KIRSNER *et al.*, 1993). Essas substâncias são importantes indutoras da migração e proliferação celular, da angiogênese, e da formação da matriz extracelular. Desta forma os macrófagos parecem exercer função singular na transição inflamação-reparo (SINGER, CLARK, 1999).

FIGURA 4: Predominância de macrófagos na ferida nos 2 a 3 primeiros dias.



FONTE: MATHES, 2006.

Inúmeras substâncias químicas agonistas e antagonistas da inflamação estão envolvidas de forma harmônica no processo de cicatrização. Dentre os mediadores derivados dos mastócitos (histamina, serotonina, heparina e bradicinina) a histamina representa a principal substância liberada pelos grânulos, sendo responsável pela dilatação de arteríolas e aumento da permeabilidade das vênulas (NOLI, MIOLO, 2001).

As prostaglandinas e leucotrienos são potentes substâncias biológicas derivadas do ácido araquidônico. São produzidas a partir de fosfolipídeos da membrana celular, por praticamente todas as células envolvidas na lesão. As prostaglandinas D_2 , E_2 e $F_{2\alpha}$ têm importante ação

vasodilatadora, contribuindo para formação do edema local. A prostaglandina E_2 também tem atividade quimiotática e parece agir em sinergia com outras substâncias inflamatórias como a bradicinina, sensibilizando neuroreceptores de dor, causando estados de hiperalgesia. Quanto aos leucotrienos (LT), o LTB_4 caracteriza um potente agente quimiotático, induzindo agregação de neutrófilos. Já o LTC_4 , LTD_4 e LTE_4 causam vasoconstrição e aumentam a permeabilidade vascular (SAPIRSTEIN, BONVENTRE, 2000).

O sistema complemento, constituído por mais de 30 proteínas, representa outra grande classe de substâncias envolvidas no processo inflamatório. Inúmeros produtos resultantes da ativação do sistema complemento estão envolvidos na estimulação da fagocitose por neutrófilos e macrófagos, na aglutinação e destruição de toxinas e microorganismos, e na ativação de outras células inflamatórias como mastócitos e basófilos, liberando inúmeras outras substâncias vasoativas (SCHMIDT, COLTEN, 2000).

Os fatores de crescimento também desempenham papel fundamental no processo de reparo tecidual (BARRIENTOS *et al.*, 2008) (QUADRO 2). O PDGF é um importante e potente fator de crescimento, agindo principalmente no início da fase inflamatória como fator quimiotático para macrófagos (HOSGOOD, 1993) e neutrófilos (DEUEL *et al.*, 1982), e como fator mitogênico para fibroblastos e células musculares lisas (KATZ *et al.*, 1991). Muitos fatores de crescimento secretados por macrófagos influenciam a proliferação celular, angiogênese e síntese da matriz extracelular. O TGF- α exerce forte influência na migração de queratinócitos e reepitelização. O TGF- β_1 , TGF- β_2 e TGF- β_3 promovem forte estímulo na migração de fibroblastos e células endoteliais, bem como na deposição da matriz extracelular pelos fibroblastos durante a formação do tecido de granulação (LI *et al.*, 2007).

Quadro 2. Principais fatores de crescimento e citocinas envolvidos no processo cicatricial, tipos celulares e seu papel nas feridas agudas e crônicas.

Fator de Crescimento	Célula	Ferida Aguda	Função	Ferida Crônica
EGF	Plaquetas Macrófagos Fibroblastos	Níveis Aumentados	Reepitelização	Níveis Diminuídos
FGF-2	Queratinócitos	Níveis	Formação de	Níveis

	Mastócitos Fibroblastos Células Endoteliais Células Musculares Lisas Condrócitos	Aumentados	Tecido de Granulação Reepitelização Formação de Matriz Extracelular e Remodelamento	Diminuídos
TGF- β	Plaquetas Queratinócitos Macrófagos Linfócitos Fibroblastos	Níveis Aumentados	Inflamação Formação de Tecido de Granulação Reepitelização Formação de Matriz Extracelular e Remodelamento	Níveis Diminuídos
PDGF	Plaquetas Queratinócitos Macrófagos Células Endoteliais Fibroblastos	Níveis Aumentados	Inflamação Formação de Tecido de Granulação Reepitelização Formação de Matriz Extracelular e Remodelamento	Níveis Diminuídos
VEGF	Plaquetas Neutrófilos Macrófagos Células Endoteliais Células Musculares Lisas Fibroblastos	Níveis Aumentados	Formação de Tecido de Granulação	Níveis Diminuídos
IL-1	Neutrófilos Monócitos Macrófagos Queratinócitos	Níveis Aumentados	Inflamação Reepitelização	Níveis Aumentados
IL-6	Neutrófilos Macrófagos	Níveis Aumentados	Inflamação Reepitelização	Níveis Aumentados
TNF- α	Neutrófilos Macrófagos	Níveis Aumentados	Inflamação Reepitelização	Níveis Aumentados

Legenda: EGF – Fator de Crescimento Epidérmico. FGF – Fator de Crescimento Fibroblástico. TGF – Fator de Crescimento Transformador. PDGF – Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas. VEGF – Fator de Crescimento Derivado do Endotélio. IL – Interleucina. TNF – Fator de Necrose Tumoral. Adaptado de Barrientos, 2008.

2.1.2 Fase Proliferativa

Esta fase, também conhecida como fibroplasia, caracteriza-se por intensa migração e proliferação de fibroblastos, produção de colágeno e outras proteínas da matriz extracelular, os quais contribuem para a formação do tecido de granulação (PHILLIPS, 2000). Nesta fase, a reepitelização e a angiogênese são marcantes (WILGUS, 2008).

A fase proliferativa é constituída por quatro etapas fundamentais: epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno. Esta fase tem início ao redor do 4º dia após a lesão e se estende aproximadamente até o término da segunda semana (CAMPOS *et al.*, 2008).

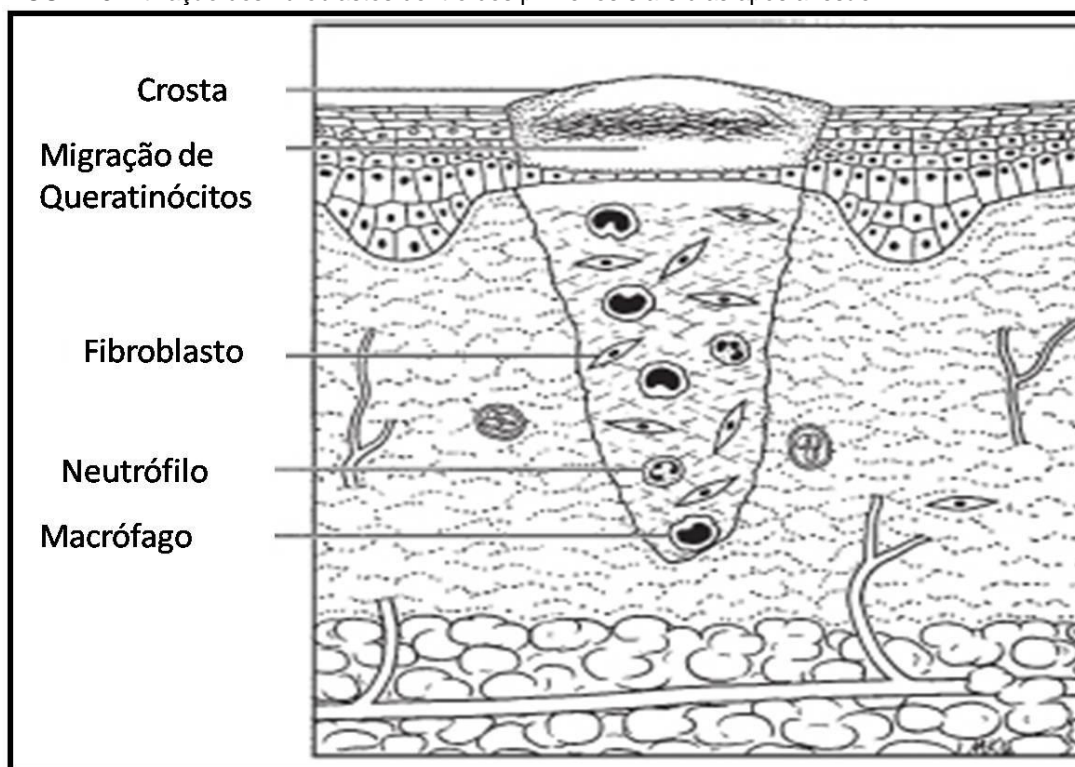
A epitelização ocorre precocemente. Se a membrana basal estiver intacta, as células epiteliais migram em direção superior, e as camadas normais da epiderme são restauradas em 3 dias. Se a membrana basal for lesada, as células epiteliais das bordas da ferida começam a proliferar na tentativa de restabelecer a barreira protetora (LAWRENCE, DIEGELMANN, 1994; LI *et al.*, 2007).

A angiogênese é estimulada pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e é caracterizada pela migração de células endoteliais e formação de capilares, essencial para a cicatrização adequada. A parte final da fase proliferativa é a formação de tecido de granulação. Os fibroblastos e as células endoteliais são as principais células da fase proliferativa. Os fibroblastos dos tecidos vizinhos migram para a ferida, porém precisam ser ativados para sair de seu estado de quiescência. O fator de crescimento mais importante na proliferação e ativação dos fibroblastos é o PDGF. Em seguida é liberado o TGF- β , que estimula os fibroblastos a produzirem colágeno tipo I e a transformarem-se em miofibroblastos, que promovem a contração da ferida (BROUGHTON *et al.*, 2006a).

Entre os fatores de crescimento envolvidos no processo cicatricial podem ser citados o PDGF, que induz a proliferação celular, a quimiotaxia e a síntese matricial; o fator epidérmico, que estimula a epitelização; o fator transformador alfa, responsável pela angiogênese e pela epitelização; o fator fibroblástico, que estimula a proliferação celular e angiogênese e o fator transformador beta, responsável pelo aumento da síntese matricial (WITTE, BARBUL, 1997) (QUADRO 1).

Na fase proliferativa (FIGURA 5), macrófagos, fibroblastos e vasos sangüíneos estão presentes no tecido de granulação ao mesmo tempo. Logo após a lesão, os fibroblastos das margens da ferida começam a se proliferar, atingindo o pico de proliferação no 7º dia pós-trauma. Uma vez ativados, os fibroblastos sofrem alterações fenotípicas e potencializam a produção de proteínas (WELCH *et al.*, 1990). Em torno do 4º dia migram para a matriz provisória e iniciam a síntese protéica, transformando-a em uma matriz rica em colágenos, proteoglicanos e elastina (WOODLEY *et al.*, 1985). Alguns fibroblastos adquirem características fenotípicas de miofibroblastos e participam do processo de contração cicatricial (WELCH *et al.*, 1990).

FIGURA 5: Ativação dos fibroblastos dentro dos primeiros 3 a 5 dias após a lesão.



FONTE: MATHES, 2006.

A maioria dos fatores quimiotáticos para os fibroblastos são derivados dos macrófagos presentes na ferida. Fatores de crescimento, especialmente o PDGF (WESTERMARK *et al.*, 1996) e o TGF- β 1 (HINCK *et al.*, 1996), em conjunto com moléculas da matriz extracelular, estimulam os fibroblastos em torno da ferida a se proliferar, a expressar receptores de integrina, e a migrar

para a área cruenta (GRAY *et al.*, 1993; XU, CLARK, 1996). O fator de crescimento epidérmico e fibroblástico, bem como a diminuição do pH e da pressão parcial de oxigênio na ferida também modulam a migração e proliferação dos fibroblastos (LI *et al.*, 2007). Além desses fatores, moléculas estruturais da matriz extracelular provisória também contribuem sobremaneira para a formação do tecido de granulação nesta fase. A fibronectina, uma importante glicoproteína desta matriz, exerce função de estímulo e suporte para fibroblastos e para o colágeno produzido, mediando também o fenômeno de contração. Quando é produzida abundante matriz colágena, os fibroblastos cessam a síntese protéica e sofrem apoptose, tornando a matriz extracelular, anteriormente rica em fibroblastos, em uma cicatriz relativamente acelular (DESMOULIERE, 1995).

Os principais eventos da fase proliferativa (BAUM, ARPEY, 2005) podem ser visualizados no Quadro 3.

QUADRO 3: Fase Proliferativa da Cicatrização.

Tempo	Macroscopia	Processo	Células	Moléculas de Adesão Celular	Componentes da Matriz Extracelular	Fatores de Crescimento e Enzimas
24 a 48h	Crosta	Reepitelização	Queratinócitos	$\beta 1$ Integrinas	Matriz Extracelular Provisória Colágeno Fibronectina Vibronectina Tenascina E	MMP/TIMP FGF-2 FGF-7 FGF-10 GM-CSF Óxido Nítrico TGF- β NGF HGF HB-EGF IL-6 Leptina sAPP
	Neoepiderme					
4º ao 7º dia	Tecido de Granulação	Angiogênese	Células Endoteliais	$\alpha 1\beta 3$ Integrina	Matriz Extracelular Provisória Colágeno GAG Proteoglicanas	MMP/TIMP VEGF FGF Angiopoitina TGF- β PDGF
3º ao 21º dia	Deposição de Colágeno	Fibroblastos	Integrinas		FGF-2	EGF IGF-1
2º dia até semanas	Produção de Fatores de Crescimento	Macrófagos			S1P	CTGF Cyr61

Legenda: CTGF – Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo; Cyr61 – Cisteína 61; EGF – Fator de Crescimento da Epiderme; FGF – Fator de Crescimento do Fibroblasto; GM-CSF – Fator Estimulador de Colônia de Macrófagos; GAG – Glicosaminoglicanas; GRO – Oncogene relacionado ao Crescimento; HB-EGF – Ligante à Heparina do Fator de Crescimento Epidermal; HGF – Fator de Crescimento Hepatocítico; IGF – Fator de Crescimento Semelhante à Insulina; IL – Interleucina; MMP – Metaloproteinase; NGF – Fator de Crescimento Neural; PDGF - Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas; sAPP – Proteína Precursora do Amilóide; S1P – Fosfato de esfingosina 1; TGF – Fator e Crescimento Transformador; TIMP – Fator Tecidual Inibidor de Metaloproteinases; VEGF – Fator de Crescimento Endotelial.

Adaptado de Baum e Arpey, 2005.

2.1.2.1 Reepitelização

A reepitelização das feridas é um fenômeno precoce, que se inicia algumas horas após a lesão. Primeiramente, os queratinócitos respondem

ao defeito epidérmico migrando das bordas íntegras do epitélio em direção ao centro da lesão ou migram dos apêndices dérmicos remanescentes (LI *et al.*, 2007). Para isso, intensas alterações fenotípicas são necessárias, incluindo achatamento e alongamento dos queratinócitos, retração de tonofilamentos intracelulares, dissolução da maioria dos desmossomas intracelulares que promovem conexões físicas entre as células, e formação de filamentos de actina no citoplasma periférico que permitem a movimentação celular (GOLIGER, PAUL, 1995). Devido à dissolução dos hemidesmossomas, as células epidérmicas não mais se aderem à membrana basal (PARKS, 1999).

Além das alterações intrínsecas, outros elementos têm sido implicados no processo de migração dos queratinócitos. Uma matriz extracelular provisória formada por fibrina, fibronectina e colágeno tipo V permite a migração e dissecação das células entre a crosta sobrejacente e o tecido cicatricial (CLARK *et al.*, 1982). Os queratinócitos interagem com a matriz provisória rica em fibronectina através de receptores de integrina na superfície das células, o que também direciona o processo de migração. A dissociação destas ligações queratinócito-matriz provisória por metaloproteinases e pela ativação da plasmina permite a migração progressiva das células sobre o tecido de granulação (PARKS, 1999).

Um a dois dias após a lesão inicial, as células epidérmicas adjacentes às células ativas em migração começam a se proliferar (LAPLANTE *et al.*, 2001). Os estímulos para proliferação e migração das células epidérmicas ainda não estão definidos. A ausência de células vizinhas nas margens da ferida, a liberação local de fatores de crescimento – sendo os principais o fator de crescimento epidérmico, o TGF- α e o fator de crescimento derivado dos queratinócitos – associado ao aumento da expressão de receptores dos fatores de crescimento poderiam estimular o processo de proliferação e migração das células epidérmicas ((WERNER *et al.*, 1994; NANNY *et al.*, 1996; LI *et al.*, 2007). Com a reepitelização, proteínas da membrana basal reaparecem de forma ordenada, da periferia para o centro da lesão. As células epidérmicas readquirem as características fenotípicas originais, aderindo-se firmemente à membrana basal e derme neoformadas (CLARK *et al.*, 2000).

2.1.2.2 Restauração da Membrana Basal

Além da reepitelização, a reconstituição da membrana basal também é essencial ao retorno da integridade e função da pele. Após 7 a 9 dias depois da reepitelização, a membrana basal está restaurada. Ela serve como apoio e base de migração para os queratinócitos devido à formação dos hemidesmossomos de ancoramento e fibrilas de ancoragem. O melhor exemplo clínico desse processo são os pacientes portadores de epidermólise bolhosa, que possuem uma mutação da proteína laminina 5 (filamento de ancoragem primordial) (CIUBOTARU *et al.*, 2003).

A membrana basal é composta de múltiplas proteínas que formam a matriz extracelular. O colágeno tipo IV é o principal constituinte e forma uma rede tridimensional e elétron-densa (ou lâmina densa). O colágeno tipo VII (também chamado fibrilas de ancoragem) comunica a lâmina densa com a derme papilar, formando a estrutura chamada placa de ancoragem. Outro colágeno importante é o XVII (também chamado antígeno bolhoso penfigóide), localizado nos complexos de hemidesmossomos dos queratinócitos basais (LI *et al.*, 2007).

As lamininas são as principais proteínas não colágenas da membrana basal. Vários são os tipos diferentes de lamininas, mas as de número 5 e 10 são as principais no processo de cicatrização (MCGOWAN, MARINKOVICH, 2000). A laminina 5 é a primeira a ser estimulada pelos queratinócitos no processo de reepitelização (NGUYEN *et al.*, 2000). Apenas recentemente o papel da laminina 10 (localizada na lâmina densa) foi descrito e relacionado à discontinuidade da membrana basal e defeitos do desenvolvimento de folículos pilosos (LI *et al.*, 2006).

2.1.2.3 Reconstituição da Derme

A reconstituição da derme tem início aproximadamente 3 a 4 dias após o trauma, e é caracterizada principalmente pela formação de tecido de granulação (que inclui neovascularização, acúmulo de fibroblastos e matriz extracelular). Esta matriz extracelular chamada “provisória” é formada pela rede de fibrina (proveniente do processo de coagulação), rica em fibronectina que possibilita a migração celular e angiogênese (LI *et al.*, 2007).

2.1.2.3 Angiogênese

Angiogênese refere-se ao processo de formação de novos vasos sanguíneos, a fim de prover nutrientes e oxigênio ao tecido cicatricial, além de permitir a migração de células inflamatórias para a ferida. Em resposta à lesão inicial, as células endoteliais da microcirculação iniciam o processo angiogênico, que consiste na ativação destas células, degradação da sua membrana basal, proliferação celular, formação da estrutura capilar tubular, e reconstituição da membrana basal (SINGER, CLARK, 1999).

As células endoteliais emitem pseudópodos citoplasmáticos após o segundo dia da lesão e, estimuladas pela secreção de metaloproteinases na matriz extracelular, invadem o espaço perivascular (KALEBIC *et al.*, 1983). De forma semelhante às lingüetas das células epidérmicas em regeneração, as células endoteliais próximo ao coto vascular seccionado migram para o interior da ferida, sem ainda proliferarem-se de forma ativa (FOLKMAN, 1982).

Para que as alterações fenotípicas, migração e proliferação das células endoteliais ocorram, vários estímulos angiogênicos são necessários. As citocinas liberadas pelos macrófagos, a baixa concentração de oxigênio,

o aumento da concentração de ácido láctico e a presença de aminas produzidas na ferida estimulam o processo de angiogênese (DETMAR *et al.*, 1997; DETMAR, 2000). Vários fatores humorais também exercem importante papel neste processo, incluindo o fator de crescimento fibroblástico, TGF- β , angiopoetinas e, sobretudo, o fator de crescimento vascular endotelial (FOLKMAN, D'AMORE, 1996; FLAMME *et al.*, 1997). Nos primeiros três dias após a lesão, o principal fator estimulador da angiogênese é o fator de crescimento fibroblástico, enquanto do 4º ao 7º dia, durante a formação do tecido de granulação, o fator de crescimento vascular endotelial torna-se mais importante (NISSEN *et al.*, 1998).

A matriz extracelular também tem importante participação neste processo, seja atuando como fator de suporte para os novos capilares, ou como reservatório de inúmeros fatores de crescimento. Têm-se demonstrado que as lamininas são as proteínas mais importantes da matriz para o processo angiogênico (LI *et al.*, 2003). Quando o espaço da ferida é completamente preenchido por tecido de granulação, a angiogênese cessa e muitos dos vasos sanguíneos formados desintegram-se por apoptose (ILAN *et al.*, 1998). Essa morte programada provavelmente é regulada por uma variedade de moléculas da matriz extracelular, como trombospondina 1 e 2 (GUO *et al.*, 1997), além de fatores antiangiogênicos como endostatina e angiopoetina 2 (FOLKMAN, 1997).

2.1.2.3 Contração da Ferida

A contração das feridas, processo que ocorre de forma centrípeta, a partir da periferia em direção ao centro da ferida, tem grande papel no fechamento das feridas (FARAHANI, KLOTH, 2008). Em seres humanos, é responsável pelo fechamento de 20 a 30% das feridas cutâneas e em animais de pele menos aderida aos planos profundos (como os ratos) pode chegar de 80 a 90% (MCGRATH, SIMON, 1983).

A contração das feridas cutâneas inicia-se logo após o trauma e se intensifica na segunda semana. O grau de contração varia dependendo da

profundidade da lesão. Em feridas cutâneas de espessura total, o fenômeno de contração é parte importante do processo de cicatrização, reduzindo em até 40% a extensão da ferida. Em lesões de espessura parcial, a contração é menor, porém diretamente proporcional à profundidade da ferida (LI *et al.*, 2007).

A contração da ferida é um fenômeno complexo que se faz por interação ordenada de células, matriz extracelular e fatores estimulantes. Devido a propriedades contráteis, o miofibroblasto é a principal célula envolvida na contração cicatricial, tendo sido descrito como uma célula com características intermediárias entre o fibroblasto e a célula muscular lisa. (DESMOULIERE *et al.*, 1997). Durante a formação do tecido de granulação alguns fibroblastos são gradualmente transformados em miofibroblastos. A diferenciação do miofibroblasto é um processo ordenado, regulado por citocinas específicas, dentre elas o TGF- β 1, por componentes da matriz extracelular e pela presença de forças mecânicas na ferida. Estas células apresentam microfilamentos contráteis ao longo da membrana citoplasmática, similares aos observados em células de músculo liso e normalmente não encontrados nos fibroblastos da pele normal (WELCH *et al.*, 1990). Observa-se aumento na expressão de marcadores característicos de fibras musculares lisas – actina, miosina e desmina – a partir do 6º dia do trauma, atingindo o maior nível no 15º dia, e regredindo progressivamente nos dias subseqüentes (DARBY *et al.*, 1990).

Além da diferenciação fenotípica dos miofibroblastos, a contração da ferida também é mediada por uma série de fatores inflamatórios, incluindo TGF- β 1 e β 2, PDGF, 5-hidroxitriptamina, angiotensina, vasopressina, bradicininas, epinefrina e norepinefrina; bem como por interações célula-célula e célula-matriz (SETHI *et al.*, 2002). Os miofibroblastos formam pseudópodos e, através dos receptores de integrina da membrana, promovem conexão dos filamentos de actina citoplasmáticos com a fibronectina da matriz. Estas se ligam às fibras colágenas e, com a contração dos microfilamentos citoplasmáticos, causam a compactação do tecido conjuntivo cicatricial, e conseqüente retração da ferida (SCHIRO *et al.*, 1991). Assim, a taxa de contração é diretamente proporcional ao número de miofibroblastos da ferida e inversamente relacionada à concentração de

colágeno na matriz (BELL *et al.*, 1981). Entretanto, estudos com o bloqueio da produção de colágeno na ferida não mostraram resultados quanto às taxas de contração das mesmas (FARAHANI, KLOTH, 2008).

2.1.3 Fase de Remodelamento

Esta é a última e mais longa fase do processo de cicatrização. Consiste na substituição gradual do colágeno imaturo (tipo III) da matriz extracelular, por colágeno maduro (tipo I), bem como na redução do número de células inflamatórias e de vasos sanguíneos neoformados (WELCH *et al.*, 1990). Sua duração depende de variáveis como idade, estado nutricional do indivíduo, local da ferida, tipo de lesão e duração do processo inflamatório e proliferativo (STADELMANN *et al.*, 1998).

Na derme humana normal, as fibras colágenas constituem aproximadamente 80% do peso dérmico seco e constituem a principal proteína estrutural, fornecendo suporte, resistência e rigidez à pele (BOOTH *et al.*, 1980; UITTO *et al.*, 1980). Na derme de indivíduos adultos saudáveis, as fibras tipo I constituem 80% do colágeno total, enquanto as fibras tipo III representam somente 10%. Durante as primeiras semanas do processo cicatricial em humanos, no entanto, o colágeno tipo III é o principal tipo de colágeno produzido pelos fibroblastos. Começa a ser produzido após as primeiras 48 a 72 horas do trauma, atingindo o pico máximo de produção entre 5 e 7 dias. Assim, a quantidade total de colágeno aumenta progressivamente, atingindo seu máximo entre a segunda e terceira semana de cicatrização. Durante o período de 1 ano ou mais, a derme cicatrizada gradualmente reassume características prévias à lesão, constituindo-se basicamente de colágeno tipo I. Com um mês, a força tênsil readquire 40% do estado original e pode continuar aumentando por um ano, atingindo até 70% da resistência da pele normal (SINGER, CLARK, 1999); (LI *et al.*, 2007).

Com o fechamento da ferida, o remodelamento gradual do colágeno se faz por degradação das fibras tipo III e produção de colágeno tipo I, o

qual apresenta maior alinhamento e ligações cruzadas entre as fibrilas (EHRlich, KRUMMEL, 1996). Isso é regido por um processo bastante controlado que envolve metaloproteinases secretadas por macrófagos, células epidérmicas, endoteliais e fibroblastos da matriz cicatricial (VISSE, NAGASE, 2003). Estas enzimas geralmente são indetectáveis ou encontradas em concentrações mínimas na pele normal, sendo então estimuladas durante o processo de cicatrização por citocinas, fatores de crescimento e pelo contacto célula-matriz. Inibidores teciduais também exercem importante função na modulação da atividade dessas enzimas, sendo o equilíbrio entre ativação e inibição das metaloproteinases fundamental para o correto processo de reparo e remodelamento cicatricial (MADLENER *et al.*, 1998; VISSE, NAGASE, 2003).

Um resumo dos principais eventos biológicos da fase de remodelamento (BAUM, ARPEY, 2005) pode ser visualizado no Quadro 4.

QUADRO 4: Fase de Remodelamento da Cicatrização.

Tempo	Macroscopia	Processo	Células	Componentes da Matriz Extracelular	Principais Fatores de Crescimento e Enzimas
4 ^o ao 14 ^o dia	Aproximação das Bordas da Ferida	Contração	Miofibroblastos	Colágeno	PDGF TGF- β NGF
3 ^a semana	Aumento da Resistência da Cicatriz (20%)	Remodelamento da Matriz Extracelular	Fibroblastos	Colágeno Proteoglicanos Água	MMP/TIMP TGF- β PDGF IL-1 Cyr61
6 ^a semana	Aumento da Resistência da Cicatriz (70%)				
6 ^o mês	Aumento da Resistência da Cicatriz (80%)				
Semanas a Meses	Diminuição da Enduração da Cicatriz	Regressão do Processo Inflamatório	Macrófagos Linfócitos T	-	IL-10
Semanas a Meses	Diminuição do Rubor e dos Capilares Visíveis		Células Endoteliais	-	TSP-1 e 2 Vasostatina
Indefinido	Ausência de Apêndices Cutâneos Normais	Inabilidade de a Cicatriz Readquirir Todas as Características de uma Pele Normal	-	-	

Legenda: Cyr61 – Cisteína 61; MMP – Metaloproteinase; NGF – Fator de Crescimento Neural; PDGF - Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas; TGF – Fator e Crescimento Transformador; TIMP – Fator Tecidual Inibidor de Metaloproteinases; TSP – Trombospondina.

Adaptado de Baum e Arpey, 2005.

2.2 IMPORTÂNCIA DO COLÁGENO

O colágeno é a proteína mais abundante do organismo e constitui 30% de todas as proteínas do corpo humano. É o maior constituinte da matriz extracelular e provê resistência e suporte aos outros componentes (KAVITHA, THAMPAN, 2008). Além disso é também o principal componente do tecido conectivo em fase de cicatrização. As várias diferenças na composição química do colágeno determinam as suas funções biológicas. Foram descritas até o presente 19 isoformas (tipos) de colágeno, codificadas por um único gene. Os tipos de fibras colágenas do tecido conjuntivo são helicoidais, com uma seqüência tripeptídica repetitiva composta de glicina-X-Y, sendo X representada pela prolina e Y pela hidroxiprolina. A rica presença de glicina e prolina é necessária para que uma molécula madura de colágeno assuma a estrutura de tripla hélice (ROBSON *et al.*, 2001).

O colágeno tipo I é o mais freqüente, é sintetizado pelos fibroblastos, e é mais predominante em ossos e tendões. O tipo III é mais comumente encontrado em tecidos moles, como vasos sangüíneos, derme e fáscia. A derme contém aproximadamente 80% de colágeno tipo I e 20 % de colágeno tipo III. Já o tecido de granulação expressa 30 a 40 % de colágeno do tipo III, sendo considerado colágeno imaturo (ROBSON *et al.*, 2001).

A degradação do colágeno se inicia precocemente e é muito ativa durante o processo inflamatório. A digestão do colágeno ocorre em ambiente extracelular e é mediada por collagenases específicas. São conhecidos quatro tipos de collagenases: as séricas (elastase, catepsina C e proteinase neutra) e as metaloproteinases. A atividade das collagenases é controlada por citocinas liberadas principalmente por células inflamatórias, endoteliais, fibroblastos e queratinócitos. A formação da matriz extracelular é, pois, resultante de um balanço entre a deposição (síntese) e degradação de colágeno (CAMPOS *et al.*, 2008)

2.3 FATORES QUE INFLUENCIAM A CICATRIZAÇÃO

2.3.1. Fatores Locais

Vários fatores podem influenciar negativamente a cicatrização, dentre eles os principais são: isquemia, infecção, técnica cirúrgica inadequada, corpo estranho e edema / pressão tecidual elevada (ALLEN *et al.*, 1997; ALLENDORF *et al.*, 1997; LONGAKER *et al.*, 2001) (STEINBRECH *et al.*, 1999).

2.3.2 Fatores Sistêmicos

Sistemicamente, diversos fatores podem afetar de alguma maneira a cicatrização, dentre eles pode-se citar: Diabetes Mellitus, deficiências vitamínicas (DEODHAR, RANA, 1997), hipotireoidismo, doenças hereditárias (síndrome de Ehler-Danlos), alterações da coagulação, idade, trauma grave, queimaduras, sepse, insuficiência hepática e renal, insuficiência respiratória, tabagismo, radioterapia, desnutrição e o uso de: corticosteróides; drogas antineoplásicas (VIZZOTO *et al.*, 2003); ciclosporina A; colchicina e penicilamina (BROUGHTON *et al.*, 2006a).

Estudos experimentais comprovaram que a nicotina compromete o processo cicatricial. Skinovsky estudou, em 2000 e 2005, a influência da injeção de nicotina subcutânea na cicatrização das anastomoses de intestino delgado em ratos, e concluiu que os animais que receberam nicotina apresentaram cicatrização deficiente quando comparados ao grupo controle. (SKINOVSKI, 2000). Confirmando esses dados, Alves, em 2006, mostrou a cicatrização tecidual deficiente em ratos lactentes de mães que receberam nicotina subcutânea durante a gestação, representada pela redução da força

de tração, da deposição de colágeno tipo III, da angiogênese e dos miofibroblastos (ALVES, M., 2006).

Diversos medicamentos também foram avaliados. Em 2003, Bonin avaliou o efeito dos inibidores de bomba de prótons na cicatrização das anastomoses gástricas em ratos e concluiu que, juntamente com o aumento do pH intragástrico, ocorre melhora da cicatrização, com aumento da força de ruptura e da deposição de colágeno tipo III (BONIN *et al.*, 2005). Ainda na avaliação da cicatrização das anastomoses gástricas, em 2004, Trubian estudou o efeito do octreotide subcutâneo em ratos e concluiu que ele não altera a cicatrização gástrica (TRUBIAN, 2004). Entretanto, Urdiales, em 2006, estudou o octreotide na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos e concluiu que há melhora na deposição de colágeno tipo III, da força de ruptura e da força máxima de tração, melhorando a cicatrização (URDINALES, 2006).

Com as crescentes indicações para cirurgia no paciente com câncer, Vizzotto e Soares avaliaram a cicatrização das anastomoses após a injeção de quimioterápicos intraperitoneais em ratos e concluíram não haver diferenças significativas entre os grupos estudados (SOARES *et al.*, 2002; VIZZOTO *et al.*, 2003). Ainda sobre o câncer, Ferreira, em estudo experimental em ratos concluiu que radioterapia pré-operatória e pós-operatória diminui a força necessária à ruptura total das anastomoses colônicas e a área percentual ocupada pelo colágeno tipo I (maduro) no 4º e 8º dia de pós-operatório (FERREIRA, 2004).

2.4 MODELOS EXPERIMENTAIS DE CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA

2.4.1 Animais e Técnica Cirúrgica

Tendo em vista a enorme variabilidade clínica, riscos e limitações ético-legais encontradas nas pesquisas com seres humanos, no último século os cientistas têm utilizado animais para estudar o complexo processo

de cicatrização, com menor variabilidade de fatores genéticos e ambientais. Embora persistam consideráveis variações biológicas na resposta cicatricial mesmo em espécies geneticamente iguais, estas variâncias reduzem-se bastante, permitindo que resultados e conclusões confiáveis possam ser obtidos (DAVIDSON, 1998). Além disso, os modelos animais de cicatrização cutânea são importantes para avaliar de forma científica a eficácia de novas técnicas e substâncias terapêuticas (GOTTRUP *et al.*, 2000).

Geralmente os modelos animais procuram reproduzir problemas encontrados no processo de cicatrização humana, como deiscências, isquemias, ulcerações, infecções, cicatrizes hipertróficas e contraturas. Na seleção do modelo experimental, deve-se optar pelo modelo que mais se aproxima da situação clínica a ser estudada (GOTTRUP *et al.*, 2000; LINDBLAD, 2000). Devido à maior elasticidade, redundância e mobilidade em relação à pele humana, os ratos têm sido descritos como animais de “pele frouxa” (“*loose-skinned animals*”) (CROSS *et al.*, 1995; DAVIDSON, 1998). A derme é a principal estrutura estudada nos modelos agudos de cicatrização cutânea. No subcutâneo, os ratos também possuem o panículo carnoso, constituído por fibras musculares firmemente aderidas à base da derme. Estas características permitem maior contração cicatricial, tendo importante participação no fechamento de feridas nos ratos, o que reduz o tempo de cicatrização em relação aos humanos (DAVIDSON, 1998; GOTTRUP *et al.*, 2000). Mesmo tendo em vista diferenças evidentes de arquitetura tecidual, fisiologia, resposta imune e outros fenômenos, os pesquisadores até certo ponto consentem aproximações dos problemas experimentados nos animais com os evidenciados na prática clínica (DAVIDSON, 1998).

Apesar de algumas diferenças histológicas e fisiológicas limitarem a comparação com humanos, a maioria dos modelos de cicatrização cutânea ainda utiliza o rato como animal de experimentação (DAVIDSON, 1998). Vários fatores práticos acabam influenciando sobremaneira a escolha do rato como modelo experimental, incluindo maior disponibilidade, baixo custo, poucas necessidades específicas de bioterismo, pequeno porte, tempo de vida curto, comportamento dócil e fácil manuseio, bem como a possibilidade de retirar amostras do tecido em estudo para testes e análises laboratoriais

(CROSS *et al.*, 1995). Após vários anos de pesquisa com estes animais, outro aspecto que favorece a escolha de rato como modelo experimental é o amplo conhecimento sobre seu padrão genético e processo de cicatrização (DORSETT-MARTIN, 2004).

Os ratos podem ser classificados em duas linhagens genéticas básicas: *inbred* e *outbred*. Linhagens *inbred* são desenvolvidas após pelo menos 20 cruzamentos familiares (irmão-irmã). Os ratos *outbred* são mantidos dentro da mesma colônia de animais por pelo menos quatro gerações e têm menos de 1% das características *inbred* a cada nova geração. As duas linhagens de ratos *outbred* mais utilizadas em pesquisas experimentais são *Sprague-Dawley* e *Wistar*. Não parecem existir dados que demonstrem superioridade de alguma linhagem de rato em relação às outras no que se refere ao processo de cicatrização de feridas (DORSETT-MARTIN, 2004).

Davidson, em artigo de revisão, classificou os modelos animais de cicatrização cutânea em agudos e crônicos. Os modelos agudos reproduzem os procedimentos cirúrgicos ou feridas traumáticas em humanos. Caracterizam-se por rápida injúria tecidual, seguida por um tempo relativamente curto de cicatrização. As formas de injúria são bastante variáveis, sendo as mais comuns: incisional, excisional, queimaduras e de espaço morto. A forma incisional se faz por corte regular na pele com lâminas cirúrgicas afiadas, causando ruptura da integridade tecidual e mínimo dano aos tecidos circunvizinhos. As feridas incisionais podem fechar primária ou secundariamente. A ferida incisional fechada primariamente é excelente para análises biomecânicas de resistência, sendo menos adequadas para estudos histológicos e bioquímicos, tendo em vista a menor quantidade de tecido cicatricial em atividade (DAVIDSON, 1998).

Já o modelo excisional caracteriza-se por ressecção de um segmento variável de pele e subsequente fechamento espontâneo (secundário) do defeito. Vários métodos podem ser utilizados para criar este tipo de lesão, como biópsias tipo *punch*, lâminas, tesouras, dermatômos e laser. Além de drogas com ação sistêmica, diferentes tipos de curativos e soluções tópicas podem ser testados na área cruenta. Em ratos, os modelos excisionais de espessura total são realizados retirando-se toda espessura da pele, até o

nível da fáscia muscular, o que inclui epiderme, derme e panículo carnosos. Isso permite avaliações histológicas e bioquímicas seriadas da ferida, bem como estudos do fenômeno de contração cicatricial. Parâmetros de cicatrização podem ser avaliados e monitorados baseando-se no volume ou área excisional preenchida por tecido de granulação, taxa de reepitelização, organização histológica, angiogênese, conteúdo bioquímico e de colágeno presente no tecido de granulação (DAVIDSON, 1998).

A literatura mostra grande heterogeneidade de modelos experimentais no que se refere às características do animal utilizado, da ferida cutânea realizada, da técnica cirúrgica e anestésica empregadas, bem como dos métodos e parâmetros do processo de cicatrização avaliados. Dorsett-Martin (2004) realizou revisão bibliográfica sobre os modelos experimentais de cicatrização cutânea em ratos, a qual incluiu 55 artigos. Ratos machos foram mais utilizados que fêmeas. O peso médio dos animais foi de 250 a 300 g. Os modelos de cicatrização mais freqüentemente descritos foram o incisional e o excisional (38% cada). Somente um estudo descreveu o modelo misto, associando uma ferida incisional e outra excisional (LIU *et al.*, 2000). Quanto à localização das feridas, 78% dos estudos continham ferida no dorso do rato e 18% na região ventral. Houve grande variação quanto à dimensão das feridas. Estudos que utilizaram feridas excisionais circulares realizaram-na com diâmetros variando de 6 mm a 2 cm (NAGAPPA e CHERIYAN, 2001; PIRILA *et al.*, 2002). As feridas incisionais variaram de 5 mm a 8 cm de extensão (YARON *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 2000).

A dimensão e profundidade das feridas são detalhes importantes no estudo do processo de cicatrização. A forma e extensão da área cruenta criada quase sempre diferem do planejamento inicial, devido às propriedades elásticas e características intrínsecas da pele dos ratos. Foi observado que as feridas excisionais circulares apresentavam menor taxa de contração, sugerindo a realização de feridas quadrangulares com pelo menos 4 cm² de área cruenta para se estudar o fenômeno de contração cicatricial (CROSS *et al.*, 1995).

Quanto aos métodos e drogas anestésicas relatadas nos estudos revisados por Dorsett-Martin (2004), os anestésicos injetáveis, como pentobarbital ou associações de quetamina e xilazina, foram mais usados

que os anestésicos inalatórios. O éter foi utilizado em 11 estudos e o halotano em 2. Somente 3 dos 55 estudos revisados utilizaram agentes analgésicos no período pós-operatório.

Uma das principais vantagens dos modelos experimentais animais é a possibilidade de retirada de amostras de tecido para análises e testes laboratoriais. Inúmeras avaliações têm sido realizadas nos tecidos em estudo, incluindo observações macroscópicas, análises histológicas, dosagens bioquímicas, testes biomecânicos, além da utilização de modernos marcadores celulares e outros fatores bioquímicos envolvidos no processo de cicatrização (CROSS *et al.*, 1995; JORGENSEN, 1997; GOTTRUP *et al.*, 2000).

2.4.2 Tensiometria

Em 1853, Paget, introduziu a medida de força tênsil de tecidos ao seccionar e reparar cirurgicamente tendões de coelhos (BALLANTYNE, 1983). Mediante tecnologia rudimentar observou que o segmento reparado ganhava força ao longo do período pós-operatório. Posteriormente, em 1929, Howes *et al* sistematizaram a técnica de medida da força tênsil através de dispositivo mecânico (tensiômetro) que apresentava resultados reprodutíveis (HOWES *et al.*, 1929).

O tipo de instrumento a ser utilizado pode influenciar a medida de força de ruptura. Naresse *et al.* desenvolveram instrumento para medida da força de ruptura, o qual foi utilizado para estudo de cicatrização de anastomoses intestinais em cães. Os autores concluíram que o aparelho apresentou precisão de medida de 98%, sendo considerado instrumento adequado para estudos de cicatrização intestinal (NARESSE *et al.*, 1987). Diversos estudos utilizaram instrumento universal de ensaio mecânico computadorizado com garras de pressão pneumática e sistema eletrônico de aquisição de dados, o que permitiu que tração uniforme e constante fosse aplicada ao tecido a ser estudado (SKINOVSKI, 2000; VIZZOTO *et al.*, 2003;

COELHO-LEMONS *et al.*, 2004; FERREIRA, 2004; TRUBIAN, 2004; BONIN *et al.*, 2005; ALVES, M. R., 2006; SANTOS *et al.*, 2006; SCHMITZ, 2006; GONCALVES *et al.*, 2009).

A pressão de ruptura é utilizada principalmente para testar a cicatrização de anastomoses e é realizada através da conexão de uma de suas extremidades a uma bomba de insuflação e fechando-se a outra. Através desta última infunde-se líquido ou ar atmosférico até que haja ruptura da anastomose. A pressão de ruptura é registrada por manômetro ou fisiógrafo. Este método pode ser aplicado ao animal vivo e anestesiado, sem se desfazerem as aderências perianastomóticas ou em segmento ressecado; os resultados serão diferentes nos dois casos, mas ambos com validade científica (BEZERRA *et al.*, 2006).

A força de ruptura é medida pela força de tração do segmento de tecido até que o mesmo se rompa. Fahart *et al.* desenvolveram dispositivo mecânico para efetuar a tração de um segmento de tecido e o utilizaram para avaliação de anastomoses em processo de cicatrização (FARHAT *et al.*, 1958). Posteriormente houve aprimoramento do método, com o desenvolvimento de um dispositivo eletro-mecânico, descrito por Jonsson *et al.*, com maior precisão para a aferição da força de ruptura (JONSSON *et al.*, 1983). A tração pode ser exercida com aumento contínuo da força ou aumentando-se a força em intervalos (BLOMQUIST *et al.*, 1984).

Mais recentemente foi desenvolvido método mecânico computadorizado de alta precisão para a determinação da força de ruptura. A correlação entre este método e o método de pressão de ruptura, já consagrado na literatura, demonstrou que a força máxima de tensão seria o melhor método para avaliação biológica da cicatrização das anastomoses, enquanto a pressão de ruptura seria mais adequada na pesquisa de integridade anastomótica em geral, não refletindo o processo cicatricial (IKEUCHI *et al.*, 1999).

Considerando-se o que foi exposto, hoje, os métodos de tração são considerados padrão ouro para a avaliação da cicatrização de feridas, sendo os parâmetros geralmente avaliados incluem a força máxima, a força de ruptura e a tensão máxima do corpo de prova (DAVIDSON, 1998). Na revisão realizada por Dorsett-Martin (2004), a maioria dos trabalhos realizou

testes de resistência da ferida utilizando aparelhos tensiométricos. Kullander e Olsson (1962) demonstraram que a resistência mecânica de feridas incisais na região dorsal de ratos diminui quanto mais caudal forem realizadas as feridas, ressaltando a importância de se comparar estudos contendo feridas cirúrgicas com localizações semelhantes (DORSETT-MARTIN, 2004).

2.4.3 Avaliação da Contração da Ferida

A contração das feridas é um fenômeno visto de forma mais evidente em roedores e coelhos. A excisão em espessura total da pele frouxa resulta em rápida e progressiva retração das margens da lesão, presumivelmente uma característica adaptativa, a fim de reduzir a dimensão do defeito. Este processo de contração pode ser quantificado por diferentes técnicas morfométricas não-invasivas. Davidson (2001) referiu o estudo de Alexis Carrel (1910) como sendo o primeiro a introduzir o conceito de medidas de superfície de área para avaliar o índice de contração das feridas. Embora originalmente desenhado para feridas em humanos, seus princípios têm sido aplicados para estudos em animais. Diferentes métodos de quantificação da área cruenta têm sido descritos na literatura: traços em papel celofane ou plásticos transparentes, planimetria, e mais modernamente, análise digital em computador (DAVIDSON, 1998).

Para análise fotográfica, alguns programas gráficos podem ser utilizados, como o software de imagens ImageJ 1.29x ou o programa *Mirror 6.0*[®], Canfield Imaging, Fairfield, NJ, EUA, que com o auxílio de um mouse, permitem realizar o contorno manual da imagem. Através de uma unidade aleatória (pixels), tem-se a obtenção de um valor numérico correspondente à área de cada lesão cutânea analisada (PEREIRA, 2006; TOLAZZI *et al.*, 2009).

2.4.4 Análise Histológica e Densitometria do Colágeno

Os métodos histológicos de análise da cicatrização, em geral, avaliam o grau de epitelização, inflamação, neovascularização, espessura das camadas da pele, formação e maturação do colágeno. Como visto, o colágeno é o principal responsável pelo desenvolvimento da resistência mecânica na ferida cirúrgica. Utilizando a coloração com *picrosirius-red*, o colágeno pode ser avaliado através da intensificação de sua birrefringência, diferenciando-o em subtipos maduro (tipo I) e imaturo (tipo III) através do método de densitometria (DAVIDSON, 1998).

A microscopia ótica é um método de avaliação do processo de cicatrização de anastomoses intestinais muito utilizado em estudos clínicos e experimentais. Sua real importância é, de certo modo, questionada pela subjetividade na avaliação. Entretanto, quando realizada por patologistas experientes e imparciais, pode fornecer dados passíveis de quantificação que são fundamentais na análise e comparação de processos cicatriciais (CAMPOS *et al.*, 2008).

O processo de reparação pode ser avaliado mediante técnica de coloração com hematoxilina-eosina (HE), utilizando diversos indicadores tais como: exsudato neutrofílico, edema intersticial, necrose de mucosa, necrose transmural, deposição de fibrina, congestão vascular, infiltrado monomorfonuclear, atividade regenerativa da mucosa, proliferação fibroblástica, neoformação vascular, processo granulomatoso e fibrose intersticial (CAMPOS *et al.*, 2008).

Outro método histológico de grande utilidade, principalmente na avaliação e diferenciação de tipos de colágeno, é o da polarização com Picrosirius. Quando o corante sirius red F3AB, um corante ácido e forte, reage com o colágeno, sua birrefringência normal é aumentada devido ao fato de suas moléculas serem acoladas às fibrilas de colágeno de maneira que as mesmas fiquem paralelas. O estudo comparativo de órgãos de animais vertebrados por este método identificou estreita correlação entre a localização de diferentes cores e a intensidade de birrefringência com a distribuição bioquímica dos tipos I, II e III de colágeno, criando a possibilidade de diferenciação tecidual dos mesmos. O colágeno tipo I aparece como fibras espessas, fortemente birrefringentes, de coloração amarelo ou vermelho; já o colágeno do tipo III possui o aspecto de fibras

finas, fracamente birrefringentes e de coloração esverdeada. O cálculo da porcentagem das fibras, classificadas em maduras ou imaturas de acordo com a sua coloração, permite avaliação qualitativa de fibras colágenas, podendo ser utilizado em estudos de cicatrização de anastomoses intestinais (SKINOVSKI, 2000; VIZZOTO *et al.*, 2003; COELHO-LEMOS *et al.*, 2004; FERREIRA, 2004; TRUBIAN, 2004; BONIN *et al.*, 2005; ALVES, M. R., 2006; SANTOS *et al.*, 2006; SCHMITZ, 2006; GONCALVES *et al.*, 2009).

Coelho-Lemos, em estudo para verificar a influência da desnutrição intra-uterina na cicatrização da parede abdominal em ratos lactentes, idealizou o índice de maturação do colágeno (IMaC), que foi definido como a razão entre as percentagens de colágeno tipo I e tipo III. Este índice tem sido amplamente utilizado por ser de fácil reprodutibilidade e facilitar a interpretação dos resultados, onde valores acima de um (1) representam predominância de colágeno tipo I e valores abaixo de 1 representam predomínio de colágeno tipo III (COELHO-LEMOS *et al.*, 2004).

2.4.5. Imunoistoquímica

A imunoistoquímica é o método diagnóstico que tem como objetivo detectar um antígeno tecidual ou celular, mediante a utilização de anticorpo específico dirigido contra este componente celular (TORRES *et al.*, 1998). Consiste na utilização de anticorpos específicos conhecidos e manipulados quimicamente para que, ao se ligarem aos seus antígenos celulares ou teciduais correspondentes, devido a diversas reações e utilização de cromógenos, produzam alteração de coloração visível à microscopia óptica, a qual indica o antígeno específico e o quantifica (WERNER, 2002).

Para o estudo da cicatrização são utilizados a determinação da angiogênese e dos miofibroblastos. A quantificação de vasos sanguíneos foi realizada por meio da técnica de imunistoquímica, utilizando-se o anticorpo antifator VIII, também conhecido como fator de von Willebrand. O fator VIII é altamente específico para marcar tecido vascular (WERNER, 2002), e foi

utilizado como marcador de vascularização em vários estudos (SKINOVSKI, 2000; CHIBATA, 2003; ALVES, M. R., 2006).

A quantificação de miofibroblastos é realizada por meio de imunoistoquímica, utilizando-se o anticorpo anti-actina muscular lisa (actina a-sm). Estudos comprovam a importância dos miofibroblastos no processo cicatricial e demonstraram que existe relação direta entre o nível de actina a-sm e a capacidade contrátil dos miofibroblastos (HINZ *et al.*, 2001; LORENA *et al.*, 2002).

Estudos experimentais realizados recentemente demonstraram correlação direta entre a força máxima de tração (considerado padrão ouro) e a quantificação de vasos e miofibroblastos na avaliação da cicatrização dos tecidos (SKINOVSKI, 2000; ALVES, M. R., 2006).

2.4.6 Fatores de Crescimento

A biologia molecular proporcionou a quantificação da expressão gênica dos fatores de crescimento, através de complexas reações utilizando material genético encontrado no tecido de granulação das feridas. Em recente tese de doutorado, Pereira estudou os fatores de crescimento em feridas cutâneas e porém não conseguiu demonstrar haver correlação dos mesmos com a síntese de colágeno (PEREIRA, 2006).

2.5 NUTRIÇÃO E CICATRIZAÇÃO

Condições locais como isquemia, infecção, técnica cirúrgica inadequada, edema e tensão sobre a linha de sutura podem trazer prejuízos ao processo cicatricial. Alterações sistêmicas como diabetes, hipotireoidismo, desordens da coagulação, idade, trauma grave, instabilidade hemodinâmica, queimadura, sepse, insuficiência renal e hepática, tabagismo, uso de corticóide, radio e quimioterapia também podem ter influências negativas no processo de cicatrização (SAVASSI-ROCHA, LOPES, 1994). Estado nutricional adequado é fator importante para lograr processo de cicatrização, pois a dinâmica tecidual exige energia, substratos plásticos provenientes de proteínas e micronutrientes (ROBERTS *et al.*, 1998).

A prevalência de desnutrição na população de hospitalizados é alta, podendo chegar a 50,2% (WAITZBERG *et al.*, 2001; CORREIA, CAMPOS, 2003). As populações de maior risco são as dos idosos, acamados e pacientes com doenças crônicas, mais sujeitos aos efeitos da desnutrição, especialmente na presença de feridas crônicas (DEMLING, 2009). Estes pacientes hospitalizados, com deficiências nutricionais, apresentam risco maior de complicações infecciosas, insuficiência de algum órgão e óbito (JONES, HEYLAND, 2008a).

Situações de trauma e grande estresse cirúrgico aumentam a necessidade de energia e proteína pela presença de estado hipermetabólico e intenso catabolismo (KIYAMA *et al.*, 1998). Nessas situações, ocorre uma redistribuição desses macronutrientes (gordura, proteína e glicose) que são transferidos do tecido adiposo e músculo esquelético para fígado, ossos e tecidos viscerais, metabolicamente mais ativos. Essa redistribuição pode levar ao aparecimento da desnutrição em alguns dias (BABINEAU *et al.*, 1991).

A presença de desnutrição leva a várias consequências deletérias como aumento da susceptibilidade à infecções, úlceras de decúbito, crescimento excessivo de bactérias no trato gastrointestinal e má-absorção

(ELWYN *et al.*, 1975; KINNEY, WEISSMAN, 1986; MAINOUS *et al.*, 1994; SANTOS, 1994).

Em cirurgia, as disfunções das imunidades celular e humoral, com prejuízo da ativação do complemento, opsonização bacteriana e funções celulares dos neutrófilos, macrófagos e linfócitos (MAINOUS, DEITCH, 1994) leva a taxas maiores de complicações de feridas cirúrgicas (LAW *et al.*, 1973). A desnutrição protéica pode prejudicar a cicatrização de feridas por prolongar a fase inflamatória, diminuir a síntese e a proliferação fibroblástica, angiogênese e síntese de colágeno e proteoglicanos. Pode ainda reduzir a força tênsil de feridas, limitar a capacidade fagocítica de leucócitos e aumentar a taxa de infecção de feridas (HAYDOCK *et al.*, 1988).

A presença de desnutrição prévia ao trauma cirúrgico retarda a contração das feridas, com reepitelização mais lenta da epiderme, maior processo inflamatório local e retardo no processo proliferativo (HAYDOCK, HILL, 1986).

Estudos relacionando melhor nutrição à cicatrização se iniciaram com Clark em 1919 (CLARK, 1919) que constatou melhora das taxas de contração de feridas cutâneas com o uso de dieta protéica em cães. Em 1930, Harvey e Howes observaram que o uso de dietas proteicas estimulava a multiplicação e a maturação dos fibroblastos, com rápido ganho de força tênsil na fase fibroblástica (HARVEY, HOWES, 1930).

Desde então vários autores se propuseram ao estudo experimental dos efeitos deletérios da desnutrição em anastomoses colônicas (SISSON *et al.*, 1958; DALY *et al.*, 1972; BERNHARDT, 2008).

Em 2004, Coelho-Lemos *et al* publicaram um estudo que avaliou a cicatrização de ratos neonatos de matrizes desnutridas e concluíram que a desnutrição intra-útero reduz a força na ferida abdominal de ratos neonatos e que a deposição de colágeno é maior nestes animais, sugerindo que a ferida seja prioridade biológica (COELHO-LEMOS *et al.*, 2004). Gonçalves *et al* demonstraram, em 2005, que a desnutrição reduz a força de ruptura e a porcentagem de deposição de colágeno maduro nas anastomoses colônicas no 5º pós-operatório. Também que a realimentação pré-operatória por sete dias aumenta a força de tração e a porcentagem de colágeno maduro (GONCALVES *et al.*, 2009). Complementando o estudo de Gonçalves,

Schmitz, em 2006, avaliou o efeito da suplementação com glutamina na cicatrização de anastomoses colônicas e concluiu que a suplementação leva a melhora da cicatrização com aumento da força máxima de tração e da deposição de colágeno tipo III (SCHMITZ, 2006).

O uso de antioxidantes (vitamina C, E e Ginkgo Biloba) em ratos com feridas cutâneas, mostrou melhor viabilidade e maior taxa de angiogênese que os grupos controle (PACE *et al.*, 2006).

Partindo do princípio da manipulação nutricional, diversos estudos foram realizados com fitoterápicos, mostrando seus efeitos na cicatrização. Dentre os fitoterápicos estudados, podem ser citar a *Passiflora edulis* (maracujá); *Orbignya phalerata* (babaçu) e a *Jatropha gossypifolia* L.(pião roxo). Todos mostraram, de alguma forma, melhora na cicatrização da parede abdominal, anastomoses colônicas e gástricas, através da avaliação da força de ruptura (DA COSTA *et al.*, 2003; BALDEZ *et al.*, 2006; BEZERRA *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2006). Estudos clínicos também comprovaram os efeitos negativos da desnutrição em pacientes cirúrgicos (RADY *et al.*, 1997).

O objetivo da terapia nutricional na cicatrização de feridas é prevenir ou repor a depleção dos nutrientes essenciais ao organismo, aumentar a velocidade e a qualidade da cicatrização e reduzir riscos de infecções e outros problemas que possam retardar e/ou prejudicar o processo de reparo tecidual e aumentar o tempo de internação hospitalar (KIYAMA *et al.*, 1998; MOREIRA, 2000).

2.5.1 Imunonutrição

É sabido que o trato gastrointestinal tem duas funções básicas: age como barreira ao meio externo além de ser a principal porta de entrada de nutrientes. As células do epitélio gastrointestinal são as primeiras a ter contato com o conteúdo intra-luminal e, desta forma acabam por sofrer maior

influência das substâncias presentes na dieta ingerida (DUGGAN *et al.*, 2002).

O termo alimento funcional está relacionado ao fato de o alimento ingerido apresentar funções fisiológicas diferentes de suas funções como nutriente (ROBERFROID, 2000). O interrelacionamento entre nutrição e imunidade tem sido objeto de estudo de várias substâncias utilizadas nas dietas. Estes chamados imunonutrientes podem ser classificados como macro ou micronutrientes. Incluem-se várias classes como: aminoácidos (glutamina, arginina, cisteína, taurina), nucleotídeos, lipídios (ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados), vitaminas e oligoelementos (vitaminas A, C e E, zinco e selênio) (O'LEARY, COAKLEY, 1996; NEWSHOLME, HARDY, 1997; SUCHNER *et al.*, 2000; MCCOWEN, BISTRAN, 2003).

O sistema imune pode ser dividido em três áreas de atuação: barreira mucosa, defesa celular e inflamação local e sistêmica. Diante de um fator agressor sustentado, o sistema imune vai depletando seus estoques (ao que se dá o nome “paralisia imune”) pela depleção de alguns de seus “agentes farmacológicos intrínsecos” o que leva à diminuição da efetividade em controlar o fator agressor. Diante dessa realidade, a imunonutrição tem por princípio promover a pronta restauração das reservas e, dessa forma reestabelecer o sistema imune do organismo afetado (SUCHNER *et al.*, 2000).

A utilização de imunonutrientes em fórmulas enterais tem sido objeto de alguns estudos na literatura. A estimulação do sistema imunológico com utilização de nutrientes como n-3 ácidos graxos, arginina e nucleotídeos tem sido relacionada à diminuição da incidência de complicações infecciosas, isto especialmente em pacientes submetidos a cirurgias no trato digestivo por câncer e em pacientes vítimas de trauma (MCCOWEN, BISTRAN, 2003; WAITZBERG *et al.*, 2006).

Dentre as fórmulas disponíveis para utilização nesse contexto encontra-se o Impact® (Novartis Nutrition, Minneapolis), que foi a dieta utilizada neste estudo (vide composição descrita na Tabela 1). A sua diferença com relação às fórmulas usuais de nutrição pré-existentes diz respeito às suas quantidades de arginina, ácidos graxos poli-insaturados e nucleotídeos (MCCOWEN, BISTRAN, 2003).

Estudos em humanos mostraram que o uso da imunonutrição leva a maiores índices de linfócitos T ativados e maiores níveis de γ interferon (WU *et al.*, 2001). Além disso os níveis das imunoglobulinas G e M também foram maiores no grupo tratado com a dieta imunomoduladora Impact® (KEMEN *et al.*, 1995). Outros achados foram: melhora da função fagocítica dos polimorfonucleares (BRAGA *et al.*, 1996), aumento do número de linfócitos T (RISO *et al.*, 2000) e diminuição do nível de interleucina-6 e do fator de necrose tumoral (WU *et al.*, 2001). Outros estudos clínicos mostraram redução no número de complicações infecciosas em pacientes submetidos a cirurgias do trato gastrointestinal (WAITZBERG *et al.*, 2006) e com menores custos de internamento no caso de pacientes oncológicos nutridos no pré-operatório (BRAGA *et al.*, 2005). Além disso, a nutrição perioperatória não se mostrou mais eficaz no que concerne à diminuição das complicações de pacientes com neoplasias gastrointestinais operados, em comparação com a nutrição apenas pré-operatória (GIANOTTI *et al.*, 2002).

Ainda não se estabeleceu de forma clara quais são os elementos constituintes mais relacionados às melhoras imunológicas, sendo ainda necessária a realização de estudos controlados que testassem seus componentes em separado (MCCOWEN, BISTRAN, 2003).

2.5.1.1 Arginina

A arginina é um aminoácido que constitui várias proteínas do corpo humano e tem seu metabolismo ligado à várias vias envolvidas com a síntese de uréia, óxido nítrico, poliaminas e creatina fosfato. Ela pode ser obtida por via oral e por síntese endógena (WU, 1998). Após a ingestão de arginina, 40% sofre degradação intestinal pela arginase e o restante é absorvido via portal (SITREN E FISCHER, 1977). A média de ingestão diária da arginina é de 5-6g/dia (SEIFTER *et al.*, 1978). A maior fonte precursora para a síntese da arginina é a citrulina circulante e também a citrulina obtida a partir dos aminoácidos prolina, glutamato e glutamina no intestino (WU, 1998). O catabolismo protéico não contribui para a produção de arginina e

óxido nítrico (NO) e, por isso em situações de estresse grave, há necessidade de suplementar arginina (WILLIAMS *et al.*, 2002; WITTE *et al.*, 2002).

A arginina pode modular importantes atividades biológicas, funções metabólicas e imunológicas. O organismo, sob condições de trauma grave, necessita de maior quantidade desse nutriente, que passa a ser classificado como aminoácido condicionalmente essencial (WITTE, BARBUL, 2003b; STECHMILLER *et al.*, 2005).

O metabolismo da arginina ocorre por meio de diversas vias, sendo as principais a do óxido nítrico e da arginase. Ambas as vias ocorrem nos locais de cicatrização levando à depleção dos estoques de arginina (BOUTARD *et al.*, 1995). A arginina participa na síntese protéica, como substrato no ciclo da uréia e produção de óxido nítrico (NO). Também é substrato para ornitina, precursora de poliaminas e outras moléculas envolvidas na cicatrização e regeneração tecidual (MILLS, 2001). A arginina age, indiretamente, na indução da secreção do fator segretagogo de crescimento insulina símile (IGF-1), importante proteína para o crescimento celular. O IGF-1 induz a enzima ornitina descarboxilase (ODC), fator limitante na síntese de poliaminas, fundamental na divisão, diferenciação e crescimento celular (LANGKAMP-HENKEN *et al.*, 1998; ZALOGA *et al.*, 2004). As poliaminas são importantes para angiogênese e apresentam funções antioxidantes ao proteger as células de danos decorrentes do estresse oxidativo (IGARASHI, KASHIWAGI, 2000).

Durante o processo cicatricial, a degradação da arginina, sinalizada por citocinas e fatores de crescimento (ALDERTON *ET AL.*, 2001), é direcionada para duas diferentes vias, via óxido nítrico sintase (NOS) e via arginase (ABD-EL-ALEEM *ET AL.*, 2000). A enzima NOS apresenta 3 isoformas que são expressas na pele (FRANK *et al.*, 2002) por diferentes tipos celulares como queratinócitos, melanócitos, fibroblastos, capilares endoteliais e macrófagos (DEGEORGE *et al.*, 1997). A síntese máxima de NOS é 24 a 72 horas pós-trauma e tem como produto final o NO e citrulina (SINGER, CLARK, 1999; FRANK *et al.*, 2002). O NO age no aumento da permeabilidade vascular, angiogênese, além de ser potente vasodilatador. Possui ação citotóxica na eliminação de bactérias presentes no local da

ferida e induz a formação de colágeno, quando produzido por fibroblastos (SCHAFFER *et al.*, 1999; WITTE, BARBUL, 2003a).

A via arginase ocorre, em geral, 72 horas após trauma, com a diminuição na produção de NO. Existem 2 tipos de arginase, a arginase tipo I é muito expressa no citoplasma hepático e participa do ciclo da uréia, enquanto a enzima arginase tipo II é de localização mitocondrial no tecido extra-hepático (EVOY *et al.*, 1998; ZALOGA *et al.*, 2004), sendo que ambas participam na degradação de arginina em ornitina. A arginase I apresenta maior atividade na produção de poliaminas enquanto a arginase II está direcionada para síntese de arginina a ornitina, prolina e glutamato (SHI *et al.*, 2002; WITTE, BARBUL, 2003a).

O efeito da suplementação de arginina não está relacionado ao aumento na produção de NO, embora descrevam-se aumento nos níveis plasmáticos de arginina e metabólitos do NO após a suplementação de arginina, provavelmente pelo aumento da hidroxiprolina (WU *et al.*, 1999). A deficiência de arginina plasmática não influencia diretamente a diminuição da síntese de NO, sugerindo que o pool de arginina endógena seja suficiente para a síntese de NO (CASTILLO *et al.*, 1995). Desconhece-se se baixas taxas de arginina tecidual possam ser fator limitante para a síntese local de NO (WITTE, BARBUL, 2003a).

A ação *in vitro* da arginina sobre a síntese de colágeno ainda não está bem definida. Evidências sugerem que os efeitos possam ser mediados por meio da síntese de NO (SHI *et al.*, 2002), embora, a síntese de colágeno pelos fibroblastos não ocorra em concomitância com a indução de síntese de NO (WITTE, BARBUL, 2002). O NO pode afetar também o processo cicatricial ao participar na regulação de algumas metaloproteinasas geradas por fibroblastos e expressas durante a fase de remodelamento, além de influenciar a ação de macrófagos, fibroblastos e o comportamento de queratinócitos (FRANK *et al.*, 2002). Assim, a função da arginina na cicatrização é em parte dependente do NO (AGREN, FRANZEN, 1990).

2.5.1.1.1 Estudos Experimentais e Arginina

Em 1978, Seifter, em estudo experimental avaliou a resistência tênsil de feridas cutâneas em ratos e a quantidade de colágeno depositado nos granulomas avaliados. A conclusão foi a de que a arginina teria dois papéis na cicatrização cutânea experimental: é essencial na síntese de colágeno em processos de reparação tecidual além de ter funções imunogênicas na resposta inflamatória estudada (SEIFTER *et al.*, 1978).

Barbul em 1983, em estudo experimental em ratos avaliou a resistência tênsil e quantidade de colágeno depositado em feridas cutâneas dorsais em ratos e obteve menor índice de perda de peso no pós-operatório de ratos suplementados com arginina, além de melhor resistência tênsil, maior quantidade de colágeno acumulado e aumento do peso do timo (BARBUL *et al.*, 1983; BARBUL *et al.*, 1984). Esta ação timotrófica da arginina, atuando como estimulante da resposta das células T, e aumenta a resposta fibroblástica durante o processo de reparação de tecidos (WITTE, BARBUL, 2002).

Em 2001, Cantürk estabeleceu, em estudo experimental, relação positiva entre a suplementação com arginina e maiores concentrações de neutrófilos na ferida, além de maior adesividade dos neutrófilos recrutados. Tal achado sugere a possibilidade de utilizar a arginina na primeira fase da cicatrização, especialmente em pacientes de risco (CANTURK *et al.*, 2001).

A suplementação de arginina em quadros de trauma e choque leva a uma reversão dos efeitos deletérios destes com a verificação de maior força de tensão e maior deposição de colágeno em feridas cutâneas dorsais em ratos (SHI *et al.*, 2007).

Vários estudos experimentais e clínicos já avaliaram os efeitos da suplementação de arginina na cicatrização cutânea, porém ainda não se tem um consenso nem sobre a sua efetividade em melhorar a resposta cicatricial nem sobre os mecanismos de ação possivelmente envolvidos (DE LUIS *et al.*, 2004; DEBATS *et al.*, 2009).

2.5.1.1.2 Estudos Clínicos e Arginina

A suplementação de arginina se mostrou benéfica no tratamento de recém-natos com enterocolite necrosante (AMIN *et al.*, 2002). Kirk *et al.* (1993) realizaram estudo randomizado e duplo-cego para investigar o efeito da suplementação oral de arginina (17 gramas de L-arginina) sobre a cicatrização e função de células T. Foram avaliados 45 voluntários sadios com idade acima de 65 anos (21 mulheres e 24 homens) que se submeteram à inserção de um cateter de polivinil-álcool na região dorsal para avaliar a resposta fibroblástica, o conteúdo de hidroxiprolina e proteínas totais. Após duas semanas, o grupo suplementado com arginina apresentou aumento significativo de hidroxiprolina, quantidade total de proteínas e maior resposta dos linfócitos periféricos à estimulação mitogênica ou ialogênica. Os níveis séricos de IGF-1 também foram significativamente maiores no grupo suplementado (KIRK *et al.*, 1993). Em 2004, de Luis e cols obtiveram menores índices de fístulas e menor tempo de internação em pacientes submetidos a cirurgias para o tratamento de neoplasias de cabeça e pescoço (DE LUIS *et al.*, 2004). Outros estudos clínicos disponíveis avaliaram a utilização da arginina em conjunto com outros nutrientes, por meio de fórmulas, já descrito no item imunonutrição.

2.5.1.2 Nucleotídeos

São importantes componentes intracelulares para a síntese de DNA (ácido desoxirribonucleico) e RNA (ácido ribonucleico). Após ingeridos, sofrem a influência do trato digestivo e são quebrados em nucleosídeos e suas bases, sendo após absorvidos. Em indivíduos normais e saudáveis a quantidade absorvida na dieta é de 1-2g/dia. Em situações de estresse as suas necessidades estão aumentadas e a sua falta leva a perda da função dos linfócitos T e diminuição dos níveis de interleucina-2 (SUCHNER *et al.*, 2000). A utilização de suplementação com nucleotídeos em ensaios clínicos, aumenta a síntese proteica, melhorando o quadro de prejuízo da função imune em quadros de perdas proteicas grandes (VAN BUREN *et al.*, 1994).

Estudos experimentais mostram melhora das funções do sistema imune e do trato gastrointestinal (LELEIKO, WALSH, 1995; COSGROVE, 1998).

Entretanto, em revisão da literatura concluiu-se que há poucas evidências que indiquem o uso de rotina da suplementação com nucleotídeos de forma isolada, no que concerne à prevenção de complicações infecciosas em pacientes gravemente enfermos (HEYLAND *et al.*, 1994).

2.5.1.3 Ácidos Graxos Poli-insaturados

Existem dois grupos de ácidos graxos considerados essenciais: os ácidos graxos ômega-3 (ou ω -3) representados pelo ácido alfa-linoleico, e os ácidos graxos ômega-6 (ou ω -6) representados pelos ácidos linoleico e aracdônico. Os ácidos graxos essenciais de cadeia longa (aracdônico – ω -6; eicosapentaenoico – ω -3; docosaexaenoico – ω -3) fazem parte da estrutura dos fosfolipídeos, componentes importantes da membrana celular e da matriz estrutural de todas as células. Além de seu papel estrutural, podem modular a função celular, atuando como mediadores intracelulares na transdução de sinais modulando interações intercelulares (RUTHIG, MECKLING-GILL, 1999).

A quantidade alimentar de ácidos graxos ω -3 e ω -6 é responsável pela composição dos fosfolipídeos de membrana. Sendo assim, a composição da gordura alimentar pode influenciar várias funções relacionadas à membrana (tais como ligação de hormônios, interações enzimáticas e transporte celular). Na dieta ocidental típica a proporção de ω -6: ω -3 varia de 10:1 a 30:1, muito diferente de 1:1 a 2:1 que acredita-se ter sido a proporção alimentar de dietas mais antigas (MCDANIEL *et al.*, 2008).

Os ácidos graxos ω -3 levam à: supressão da biossíntese de eicosanóides derivados do ácido aracdônico, levando a uma atenuação da resposta imune a estímulos inflamatórios; também têm ação na proliferação

celular, apoptose e angiogênese; influência na atividade do fator de transcrição nuclear, expressão gênica e transdução de sinais, modificando o metabolismo, crescimento e diferenciação celulares; alteração na produção de radicais livres; sensibilidade à insulina; e fluidez das membranas (RUTHIG, MECKLING-GILL, 1999; MCDANIEL *et al.*, 2008; WAITZBERG, TORRINHAS, 2009).

A conversão enzimática dos ácidos graxos ω -3 e ω -6 em eicosanóides é de grande importância. Os eicosanóides modulam a resposta inflamatória e imunológica, além de ter papel fundamental na agregação plaquetária, no crescimento e na diferenciação celulares. A produção de eicosanóides se inicia com a liberação dos ácidos graxos poli-insaturados da membrana fosfolipídica pela ação de várias fosfolipases. Após liberados esses ácidos graxos servem como substrato para ciclooxigenases, lipoxigenases e citocromo P450 monooxigenase. Ciclooxigenases e lipoxigenases agem nos ácidos graxos, produzindo prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. As prostaglandinas da série dois, produzidas a partir do ácido aracdônico, tendem a ter ação pró-inflamatória e proliferativa na maioria dos tecidos. As prostaglandinas da série três, produzidas a partir do ácido eicosapentaenoico, têm efeito inflamatório e proliferativo menor, atenuando a resposta inflamatória (JONES, HEYLAND, 2008b; TODD *et al.*, 2008).

A adição de ω -3 limita os efeitos pró-inflamatórios através da diminuição da conversão de ácido linoleico em ácido aracdônico. Além disso, ácidos graxos ω -3 substituem os ω -6 na membrana fosfolipídica, levando à diminuição da produção de eicosanóides pró-inflamatórios (como prostaglandina E2 e leucotrieno B4) e promovendo aumento na produção de eicosanóides com menor potencial inflamatório (como tromboxano e prostaglandina E3) (TODD *et al.*, 2008).

A suplementação com ácido eicosapentaenóico (EPA), ácido γ -linoleico (AGL) e vitaminas leva a menores taxas de disfunções de órgãos, tempo de ventilação mecânica e tempo de permanência em UTI, em pacientes gravemente enfermos (PONTES-ARRUDA *et al.*, 2006; PONTES-ARRUDA *et al.*, 2008). Os ácidos graxos apresentam benefícios como: redução da resposta inflamatória, efeitos antitrombóticos e manutenção da

microperfusão tecidual (FURST, KUHN, 2000) Estudos recentes em pacientes criticamente doentes mostraram redução significativa na permanência em UTI e do tempo de ventilação mecânica(WAITZBERG, TORRINHAS, 2009).

2.5.1.4 Zinco

Em pacientes críticos as deficiências de zinco, ferro e selênio têm grande prevalência, seja devido à reposição inadequada ou ao aumento das necessidades corporais. Estas deficiências podem levar a consequências deletérias em várias funções orgânicas como prejuízos da função imune e da cicatrização de feridas (SRIRAM, LONCHYNA, 2009).

O zinco é fundamental para a integridade estrutural das proteínas, sendo componente de mais de 250 metaloenzimas (tais como piruvato desidrogenase, fosfatase alcalina, DNA e RNA polimerases) (HARDY *et al.*, 2009).

O zinco também tem papel fundamental na função imune, na promoção da cicatrização de feridas e na manutenção da integridade da mucosa intestinal. As deficiências de zinco estão relacionadas a reduções na concentração de IGF-1 e redução nas taxas de síntese proteica. Em situações como a dos grandes queimados e pancreatites graves, as deficiências de zinco se tornam mais comuns, isto já que a excreção urinária de zinco aumenta com o grau de estresse catabólico. Dessa forma, a suplementação com zinco se torna necessária, sempre com a monitorização regular dos níveis séricos desse metal (O'LEARY, COAKLEY, 1996; NEWSHOLME, HARDY, 1997).

2.5.1.5 Selênio

O selênio é um oligoelemento essencial, com funções antioxidantes e imunológicas. Tem papel importante no sistema de defesa e condições de inflamação sistêmica aguda, sendo cofator de enzimas antioxidantes dentre elas a glutathione peroxidase e a tireotoxina redutase. Além do sistema imune, este metal tem ação nas funções cerebral e tireoidiana além da proteção contra doenças cardiovasculares (HARDY *et al.*, 2009).

O selênio é um elemento-traço cuja absorção varia de 35 a 85% do total ingerido. Após sua absorção, é incorporado à seleno-proteína P, principal seleno-enzima do plasma, sendo responsável por 60% do selênio total do plasma. Os outros 30% estão na glutathione peroxidase, 6 a 10% na albumina e 1% está livre na circulação. A disponibilidade de diversos oligoelementos é modificada em situações críticas. Um exemplo é o estado de SIRS (síndrome da resposta inflamatória sistêmica) que está relacionado à redistribuição dos oligoelementos da circulação para os tecidos, de forma a auxiliar na síntese proteica e proliferação de células do sistema imune. Além da SIRS, outras situações podem levar à queda do selênio sérico e incluem estados dialíticos e casos de reposição inadequada. A queda do selênio sérico está relacionada a maior incidência de complicações infecciosas e aumento das taxas de mortalidade (MAEHIRA *et al.*, 2002; HARDY *et al.*, 2009).

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O estudo faz parte da área de concentração Nutrição e Cicatrização em Cirurgia e da linha de pesquisa de cicatrização e resistência de tecidos do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da UFPR. Foi realizado de acordo com as normas de pesquisa animal dispostas na legislação nacional, obedecendo aos Princípios Éticos na Experimentação Animal postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) sendo previamente aprovado no comitê de ética em pesquisa animal da UFPR (ANEXO 1).

A normatização do trabalho segue as recomendações do Sistema de Bibliotecas (SIBI) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) estabelecidas nas Normas para Apresentação de Documentos Científicos (2007).

As condições ambientais do laboratório foram controladas eletronicamente (Cronomat®, Mallory do Brasil, São Paulo) para se manter uma temperatura de 22 graus Celsius e ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais foram mantidos no laboratório de cirurgia experimental da Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), onde também os experimentos cirúrgicos foram realizados.

3.2 ANIMAIS E ALIMENTAÇÃO

Foram utilizados 52 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), machos, adultos, provenientes do Biotério da Univale

(Universidade do Vale do Itajaí). Esses animais foram divididos em dois grupos com 12 animais e dois grupos com 14 animais, a serem descritos.

Durante todo o período de estudo os animais foram agrupados em número de 4 em gaiolas coletivas de aproximadamente 0,022 m³ (41,4 cm x 34,4 cm x 16 cm). As gaiolas, em número total de 12, foram identificadas e acomodadas sobre estantes horizontais.

Durante o período de aclimação e de estudo, os animais receberam água e ração balanceada *ad libitum* padrão Nuvilab CR1®, produzido pela empresa Nuvital Nutrientes, Colombo, PR, Brasi, cuja composição encontra-se no Quadro 5.

QUADRO 5 – Composição básica da ração balanceada fornecida aos ratos (Nuvilab CR1®).

Carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix mineral vitamínico, aminoácidos (DL-metionina e lisina).
Umidade (máximo): 12,5%
Proteína bruta (mínimo): 22%
Cálcio (máximo): 1,4%
Fósforo (mínimo): 0,8%
Estrato etéreo (mínimo): 4%
Material mineral (máximo): 10%
Matéria fibrosa (máximo): 8%
Vitaminas: A, D3, E, K3, B1, B2, B6, B12, niacina, ácido pantotênico, ácido fólico, biotina, colina.
Microelementos: ferro, zinco, cobre, iodo, manganês, selênio, cobalto.

FONTE: Nuvital Nutrientes, Colombo, PR, Brasil

3.3 DIETAS ENTERAIS PARA SUPLEMENTAÇÃO

A composição das dietas enterais industrializadas utilizadas (dieta suplementada - Impac®t e dieta controle) podem ser observados na Tabela 1.

TABELA 1 – Composição da dieta enteral Impact® e da dieta enteral controle. Quantidades por mL de dieta.

Nutrientes	Impact®	Dieta Controle
Energia	1 Kcal	1 Kcal
Proteína	0,056 g	0,056g
Nitrogênio	0,011 g	0,006g
Arginina	0,012 g	0
Lipídeos	0,028 g	0,032g
Carboidratos	0,130 g	0,127g
Fibras dietéticas	0,015 g	0,015g
Minerais		
Sódio	1,10 mg	1,00 mg
Potássio	1,40 mg	1,50 mg
Cloro	1,30 mg	1,28mg
Cálcio	0,80 mg	0,80 mg
Fósforo	0,80 mg	0,72 mg
Magnésio	0,27 mg	0,25 mg
Oligoelementos		
Ferro	0,012 mg	0,016 mg
Zinco	0,015 mg	0
Cobre	1,700 mcg	2,00 mcg
Manganês	0,002 mg	0,004 mg
Flúor	0	0,001 mg
Molibdênio	0,200 mcg	0,100 mcg
Selênio	0,100 mcg	0
Cromo	0,100 mcg	0,067 mcg
Iodo	0,100mcg	0,13 mcg
Vitaminas		
Vitamina A	2,010 mcg	0,82 mcg
Carotenóides	0	0,002 mg
Vitamina D	0,006 mcg	0,007 mcg
Vitamina E	0,040 mg	0,08 mg
Vitamina K	0,067 mcg	0,053 mcg
Tiamina	0,002 mg	0,003 mg
Riboflavina B2	0,002 mg	0,002 mg
Niacina	0,020 mg	0,018 mg
Ácido pantotênico	0,007 mg	0,005 mg
Vitamina B6	0,002 mg	0,008 mg
Ácido fólico	0,400mcg	0,300mcg
Biotina	0,200 mcg	0,040 mcg
Vitamina C	0,080 mg	0,380 mg
Colina	0	0,370 mg

Fonte: Novartis.

3.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

3.4.1 Grupos de Pesquisa

- a) Suplementação pré-operatória com a dieta em estudo (PI): os animais (em número de 12) receberam ração espécie-específica para ratos (Nuvilab CR1[®]), *ad libitum*, durante os sete dias de pré-operatório. Foi realizada neste mesmo período a suplementação com a dieta em estudo, realizada por meio de gavagem, utilizando-se a dose da dieta em estudo capaz de fornecer 0,5g arginina/Kg peso/dia. Foram submetidos à confecção de feridas excisionais e incisionais. No período pós-operatório, receberam nutrição com dieta espécie-específica para ratos, *ad libitum*, e gavagem com soro fisiológico, isovolumétrica ao cálculo da suplementação pré-operatória.
- b) Suplementação pré-operatória com a dieta controle (PC): os animais (em número de 12) receberam ração espécie-específica para ratos (Nuvilab CR1[®]), *ad libitum*, durante os sete dias de pré-operatório. Foi realizada neste mesmo período a suplementação com a dieta controle, realizada por meio de gavagem, utilizando-se dose isovolumétrica ao peso. Foram submetidos à confecção de feridas excisionais e incisionais. No período pós-operatório, receberam nutrição com dieta espécie-específica para ratos, *ad libitum*, e gavagem com soro fisiológico, isovolumétrica ao cálculo da suplementação pré-operatória.
- c) Suplementação pré e pós-operatória com a dieta em estudo (PPI): os animais (em número de 14) receberam ração espécie-específica para ratos (Nuvilab CR1[®]), *ad libitum*, durante os sete dias de pré-operatório. Foi realizada neste mesmo período a suplementação com a dieta em estudo, realizada por meio de gavagem, utilizando-se dose da dieta em estudo capaz de fornecer 0,5g arginina/Kg peso/dia.

Foram submetidos à confecção de feridas excisionais e incisionais. No período pós-operatório, receberam nutrição com dieta espécie-específica para ratos, *ad libitum*, e suplementação pós-operatória por meio de gavagem com a dose da dieta em estudo capaz de fornecer.

- d) Grupo submetido a suplementação pré e pós-operatória com a dieta controle (PPC): os animais (em número de 14) receberam ração espécie-específica para ratos, *ad libitum*, durante os sete dias de pré-operatório. Foi realizada neste mesmo período a suplementação com a dieta controle, realizada por meio de gavagem, utilizando-se dose isovolumétrica ao peso. Foram submetidos à confecção de feridas excisionais e incisionais. No período pós-operatório, receberam nutrição com dieta espécie-específica para ratos, *ad libitum*, e suplementação pós-operatória por meio de gavagem com a dose isovolumétrica da dieta controle.

3.4.2 Desenho da Pesquisa

Ração <i>ad libitum</i> (Nuvilab CR1®)			
Controle de Peso Diário			
Controle Fotográfico			
- 7 Dias	Dia Zero	7 Dias	Dia 8
<ul style="list-style-type: none"> • PI:suplementação Pré-operatória com Dieta em Estudo • PC:suplementação Pré-operatória com Dieta Controle • PPI:suplementação Pré-operatória com Dieta em Estudo • PPC:suplementação Pré-operatória com Dieta Controle 	<ul style="list-style-type: none"> • Dia da Cirurgia • Lesões Cutâneas Excisionais Dorsais • Lesão Cutânea Incisional Ventral 	<ul style="list-style-type: none"> • PI:suplementação Pós-operatória com Solução Fisiológica 0,9% • PC:suplementação Pós-operatória com Solução Fisiológica 0,9% • PPI:suplementação Pós-operatória com Dieta em Estudo • PPC:suplementação Pós-operatória com Dieta Controle 	<ul style="list-style-type: none"> • Sacrifício dos Animais • Coleta do Tecido de Granulação • Coleta da Ferida Incisional • Tensiometria das Feridas Incisionais

PI – Grupo submetido a suplementação pré-operatória com a dieta em estudo; PC – Grupo submetido a suplementação pré-operatória com a dieta controle; PPI – Grupo submetido a suplementação pré e

pós-operatória com a dieta em estudo; PPC – Grupo submetido a suplementação pré e pós-operatória com a dieta controle.

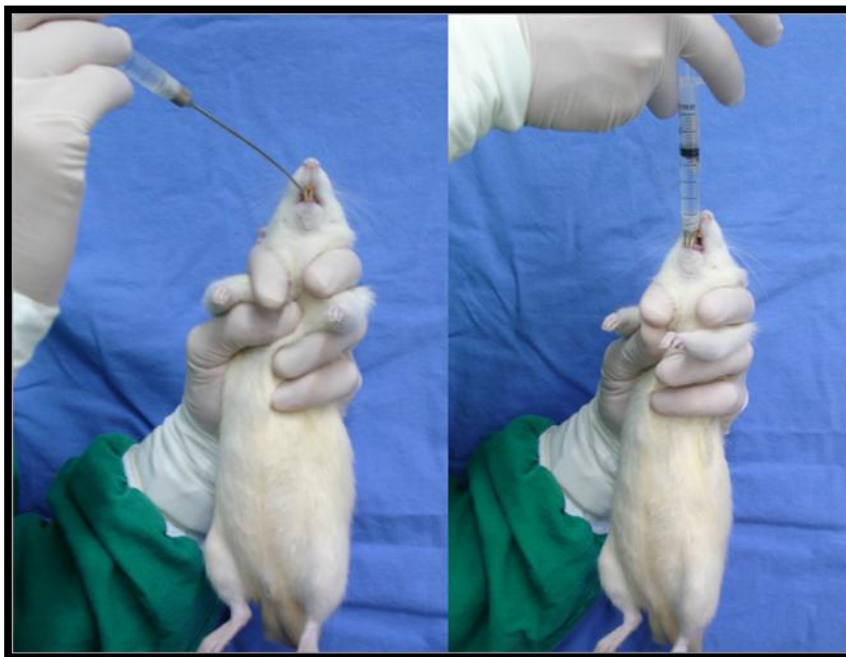
3.5 CONTROLE DE PESO

Os animais foram pesados diariamente antes de serem submetidos à gavagens, a fim de realizar o cálculo das doses diárias das dietas enterais a serem suplementadas. Utilizou-se balança eletrônica (AM 5500® Marte, São Paulo, SP) para a aferição e a unidade utilizada foi o grama (g).

3.6 GAVAGEM

A fim de administrar a dietas enterais para suplementação pré e pós-operatória, todos os animais foram submetidos à sondagem orogástrica com sonda plástica maleável sob sedação. Conforme técnica descrita anteriormente (DA COSTA *et al.*, 2003), o rato foi contido com a mão esquerda do pesquisador, enquanto na mão direita a sonda acoplada a uma seringa de 3 ml contendo a dose apropriada da dieta foi introduzida até o ponto correspondente à distância entre a boca e o apêndice xifóide do animal. Os volumes infundidos foram calculados de acordo com a dose diária de arginina. Após lenta infusão da solução e retirada da sonda, a fim de diminuir o risco de regurgitação, o rato foi mantido com a porção cefálica mais elevada que a caudal até completa recuperação anestésica.

FIGURA 6 - Método utilizado para a gavagem dos animais com as dietas estudadas



3.7 ANESTESIA

Para realização do procedimento cirúrgico inicial, da documentação fotográfica e do procedimento de gavagem diários, os animais foram submetidos à anestesia inalatória com éter etílico. Individualmente, cada rato foi colocado em uma campânula de vidro fechada, a qual continha divisória fenestrada que isolava o animal (superiormente) do anestésico e dejetos (inferiormente). Pela campânula de vidro, o plano anestésico foi monitorado pelos movimentos voluntários e respiratórios do animal, sendo retirado da campânula assim que apresentasse parada dos movimentos voluntários, preservando os movimentos ventilatórios. Este método de anestesia foi utilizado diariamente para a realização do controle fotográfico e da gavagem.

Para os procedimentos cirúrgicos, após a utilização do éter etílico conforme descrito acima, foi utilizada anestesia com o uso das drogas xilasina (10mg/Kg peso corporal) e ketamina (50mg/Kg peso corporal).

Ambas as drogas foram administradas por via intra-muscular na panturrilha dos animais.

3.8 PROCEDIMENTOS OPERATÓRIOS

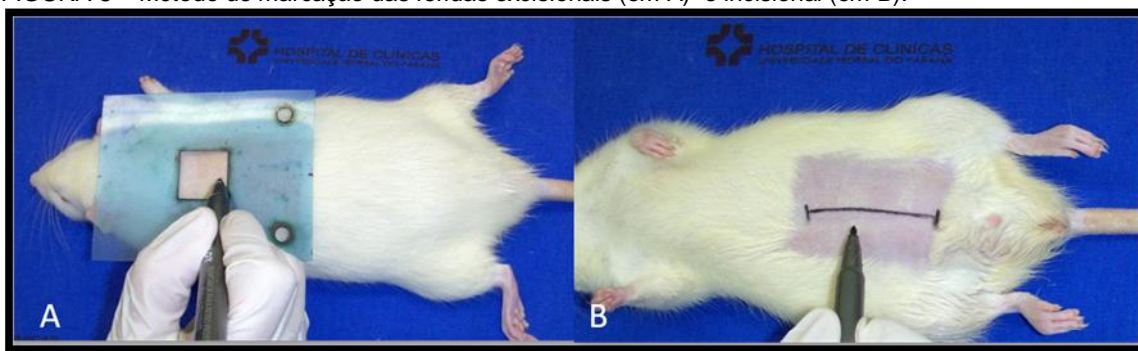
No período pré-operatório imediato os animais foram submetidos à jejum de 2 horas prévias ao procedimento cirúrgico.

Depois de anestesiado e tricotomizado, o animal foi alinhado e posicionado sobre o campo operatório, em decúbito ventral, com os quatro membros estendidos e a cabeça alinhada ao tronco. As marcações da pele foram realizadas com caneta preta específica e situaram-se na linha média dorsal do animal. No dorso anterior, a ferida excisional foi demarcada utilizando-se um molde plástico de 2 cm x 2 cm (4 cm²), mantendo a borda anterior do quadrado localizado ao nível do ângulo das escápulas (Figura 7 e 8). Na região ventral posterior, com auxílio de uma régua, a ferida incisional foi marcada longitudinalmente, medindo 5 cm de extensão. Em seguida, foi feita antissepsia da região dorsal com PVPI tópico.

FIGURA 7 – Esquema de marcação dos animais. A ferida excisional para avaliação da contração cicatricial (FECC) foi marcada aproximadamente 0,5 cm abaixo dos ângulos das escápulas, com a forma de um quadrado de lado igual a 2cm. A aproximados 2cm da região onde foi confeccionada a FECC foram realizadas duas feridas excisionais para avaliação da taxa de reepitelização da ferida (FER), na forma de círculos com 6mm de raio. Na região ventral do animal, na linha média, foi realizada a ferida incisional, com extensão de 5cm.

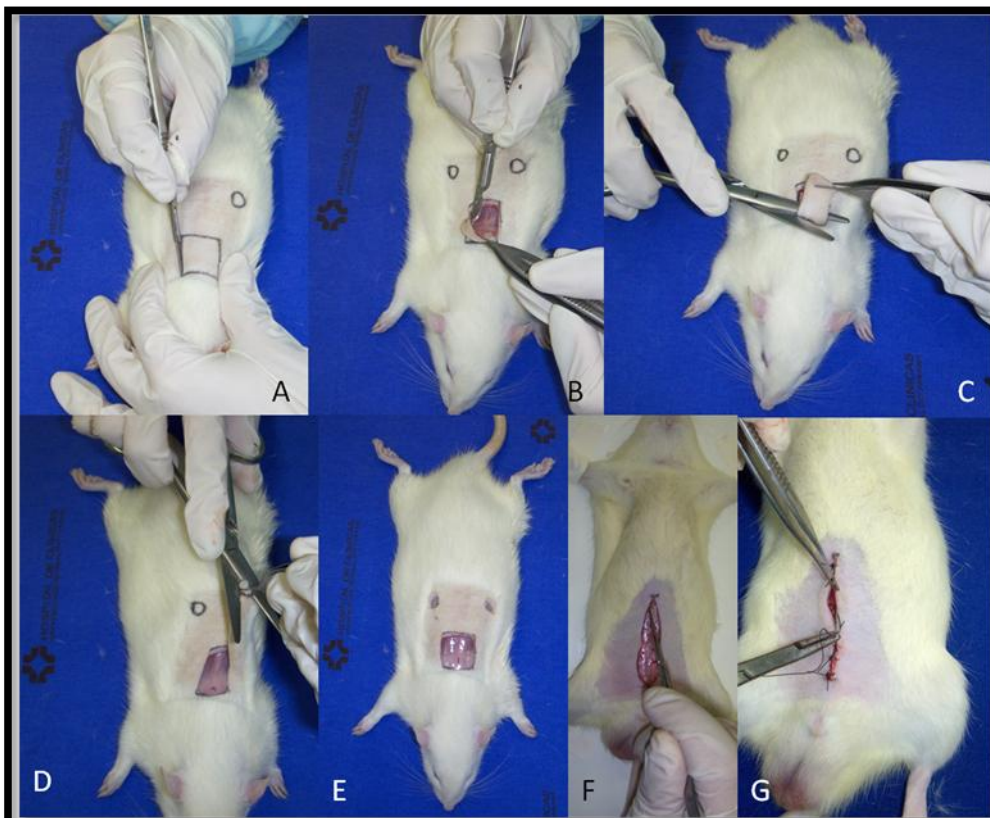


FIGURA 8 – Método de marcação das feridas excisionais (em A) e incisional (em B).



A equipe foi composta pelo cirurgião (a pesquisadora) e um auxiliar, responsável pelo monitoramento do plano anestésico do animal. Iniciou-se o procedimento cirúrgico pelo modelo excisional, incisando com bisturi a porção lateral direita do quadrado demarcado. A dissecação do segmento de pele foi feita com a tesoura de Metzembraum, em plano anatômico areolar, em nível suprafascial. As outras bordas foram seccionadas com tesoura de Mayo reta, sempre na margem interna da demarcação com caneta.

FIGURA 9 – Esquema dos procedimentos operatórios. Em A, B e C a seqüência para a realização da ferida excisional para avaliação da contração cicatricial. Em D, a confecção das feridas excisionais para avaliação da taxa de reepitelização. Em F e G a realização da ferida incisional.



Na ferida incisional, realizada na região ventral, a pele foi linearmente incisada com lâmina fria, em espessura total, até o nível da fáscia muscular. A síntese desta foi feita com sete pontos interrompidos de nylon 3-0, igualmente distribuídos pela ferida.

Ao fim do procedimento cirúrgico os ratos foram mantidos em ar ambiente até completa recuperação. Com o intuito de evitar possíveis interferências dos outros animais ainda não operados, como mordeduras na área cruenta, ao término do ato operatório cada rato foi colocado em gaiola isolada até completa recuperação anestésica. Após recuperação anestésica cada rato foi recolocado em sua gaiola de origem, onde voltou a receber, após 2 horas do procedimento, água e ração *ad libitum*.

No 8º dia pós-operatório todos os animais dos quatro grupos foram submetidos à eutanásia por dose letal de éter etílico inalatório. Logo em seguida o rato foi posicionado em decúbito ventral, fotografado e devidamente marcado para ressecção dos espécimes cirúrgicos.

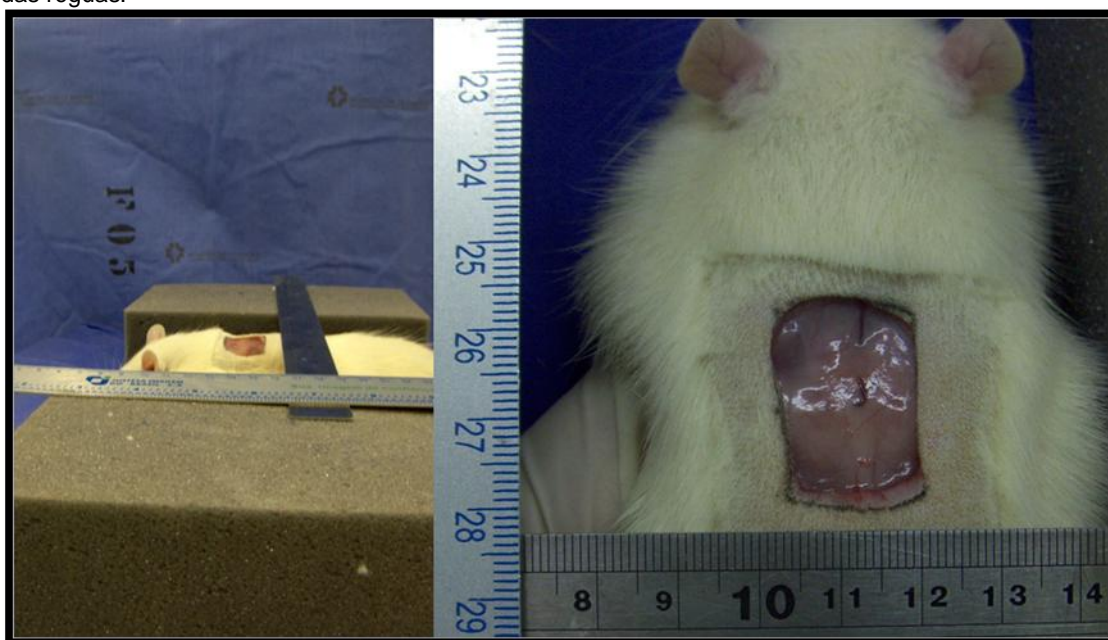
Após retirada cuidadosa dos pontos da ferida incisional, segmentos padronizados de pele foram ressecados para o teste tensiométrico e estudo histológico, tendo sido desprezado 5 mm da extremidade superior e inferior da ferida. O corpo de prova do teste tensiométrico consistiu do segmento de pele de espessura total, contendo a ferida cirúrgica no centro, medindo 2 cm de largura por 6 cm de comprimento. Esta maior extensão teve por finalidade proporcionar melhor fixação do tecido ao aparelho de tração. Para estudo histológico, foi ressecado 2 cm da porção superior da ferida incisional (pele de espessura total).

A ferida cirúrgica excisional também foi totalmente ressecada. A fim de assegurar que o tecido de granulação sobrejacente não fosse alterado pela ressecção, incluiu-se 5 mm de pele normal nas margens da lesão e tecido muscular sob a área cruenta. Os cinco espécimes foram identificados, fixados em papel filtro e armazenados em frasco contendo formalina a 10%.

3.9 CONTROLE FOTOGRÁFICO

Com técnica padronizada, as feridas excisionais foram fotografadas no período pós-operatório imediato e no 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 6º, 7º e 8º dia pós-operatório. Quando anestesiados, ao apresentarem completo relaxamento muscular, os animais foram posicionados sobre uma superfície plana, em decúbito ventral, com os quatro membros estendidos e a cabeça alinhada ao tronco. Nesta posição, a ferida excisional foi fotografada a uma distância padrão, apoiando-se a câmera fotográfica sobre uma tripé a uma distância de 15 cm. As fotos foram tiradas em ambiente iluminado com luz fluorescente, sem flash, com dispositivo macro-fotográfico ativado.

FIGURA 10 – Método de controle fotográfico, mostrando o posicionamento do animal no mesmo plano das réguas.

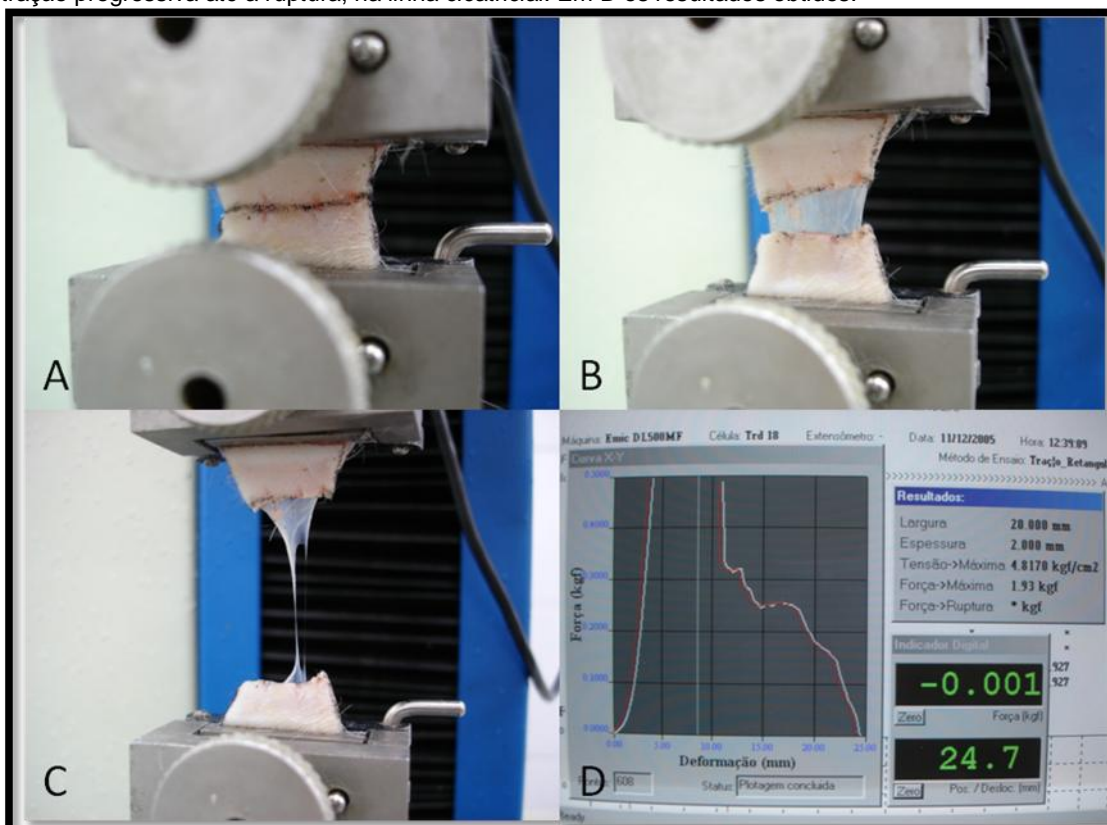


3.10 TESTE TENSIONOMÉTRICO

Para realização do teste de tração, as extremidades de cada segmento de pele (corpo de prova) foram fixadas na presilha superior e inferior do aparelho tensiométrico, mantendo a cicatriz da ferida incisional entre as porções fixada. Todos os testes foram feitos num intervalo máximo de 1 hora após ressecção dos corpos de prova. O ensaio foi comandado automaticamente pelo aparelho e a obtenção dos resultados se fez por programa de computador específico acoplado ao sistema.

A tração desenvolveu-se com velocidade de 50 mm/min, com limite de força de 4.500 kgf, até o colapso da linha cicatricial do corpo de prova. As variáveis tensão máxima e força máxima foram obtidas para cada corpo de prova testado.

FIGURA 11 – Teste Tensionométrico. Em A, a fixação do corpo de prova no aparelho. Em B e C a tração progressiva até a ruptura, na linha cicatricial. Em D os resultados obtidos.



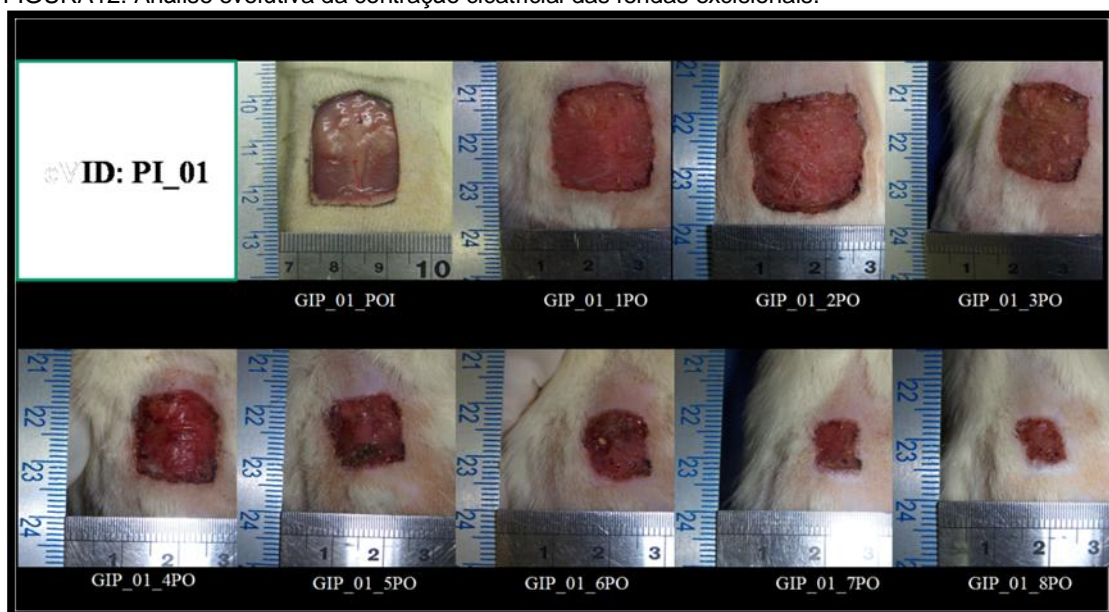
Tensão máxima foi definida como a quantidade máxima de força suportada por unidade de área de secção (kgf/cm²). Assim, esta variável foi dependente das dimensões de tecido ressecado e testado, as quais foram padronizadas em 2 cm para a largura e 2 mm para a espessura. Força máxima consistiu na maior força suportada pelo tecido até haver a perda de continuidade do mesmo (kgf).

3.11 AVALIAÇÃO DA CONTRAÇÃO CICATRICIAL

O efeito da contração cicatricial foi avaliado na ferida excisional através da análise computadorizada de fotos digitais padronizadas. Elas foram tiradas a 15 cm da superfície em que o animal sedado foi posicionado. Duas réguas graduadas em milímetros foram posicionadas ao mesmo nível do ferimento em estudo, sobre o dorso do animal (na transição cabeça-tronco).

A documentação fotográfica foi feita logo após o procedimento cirúrgico e em diferentes tempos do pós-operatório (p.o.): 24 h (1º p.o.), 48 h (2º p.o.), 72 h (3º p.o.), 96h (4º p.o.), 120h (5º p.o.), 144h (6º p.o.), 168 h (7º p.o.) e 192h (8º p.o.), como pode ser observado na Figura 12. Até o 8º dia pós-operatório, 12 animais do grupo PI, 12 animais do grupo PC, 14 animais do grupo PPI e 14 animais do grupo PPC foram fotografados e avaliados.

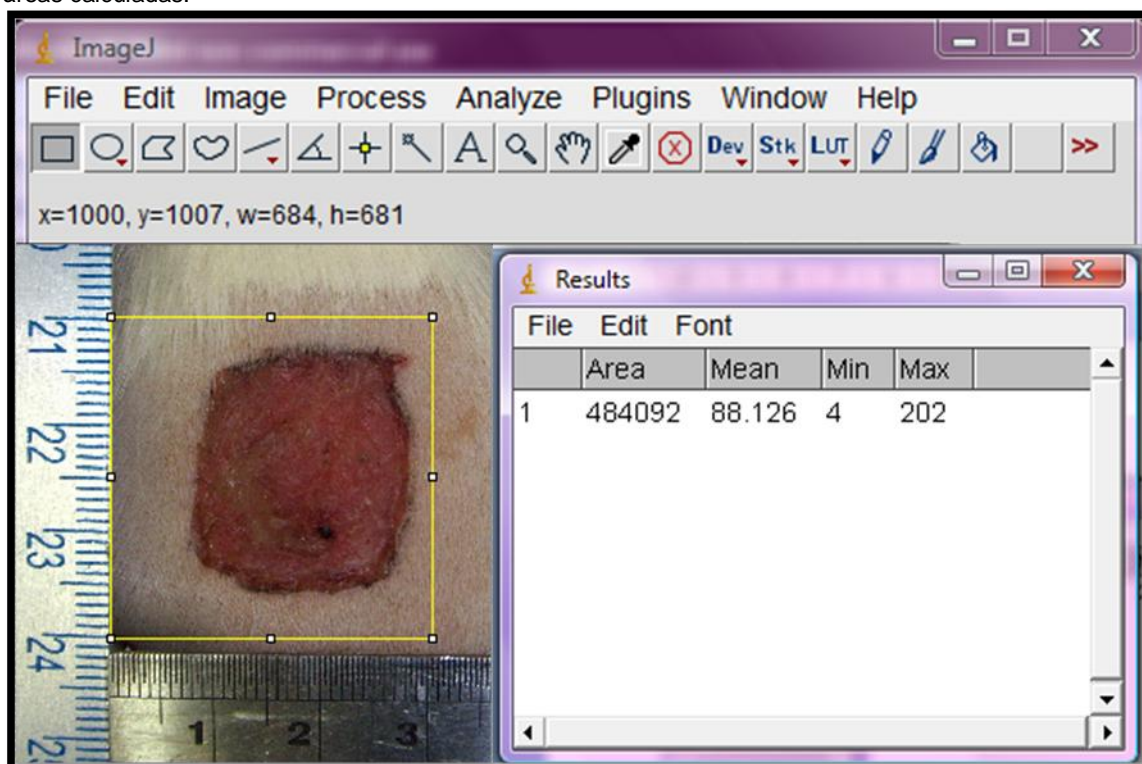
FIGURA12: Análise evolutiva da contração cicatricial das feridas excisionais.



As imagens foram analisadas em programa computadorizado específico para edição e formatação de imagens (Image J, 1,38x, National Institutes of Health, EUA) disponível para domínio público no site <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, National Institute of Health – USA.

A fim de corrigir possíveis diferenças na distância câmera fotográfica-ferida, bem como para padronizar uma unidade de medida universal para as áreas cruentas, cada imagem avaliada foi calibrada pelo programa utilizando as réguas adjacentes à ferida. Foi calculada a área de um quadrado, com lado de 3cm (medido com o auxílio das réguas adjacentes à ferida), tendo-se o resultado na unidade aleatória - pixels, que corresponde ao valor real de 9cm² (Figura 13)

FIGURA 13 – Método de calibragem das imagens, realizada para o cálculo individual de cada uma das áreas calculadas.

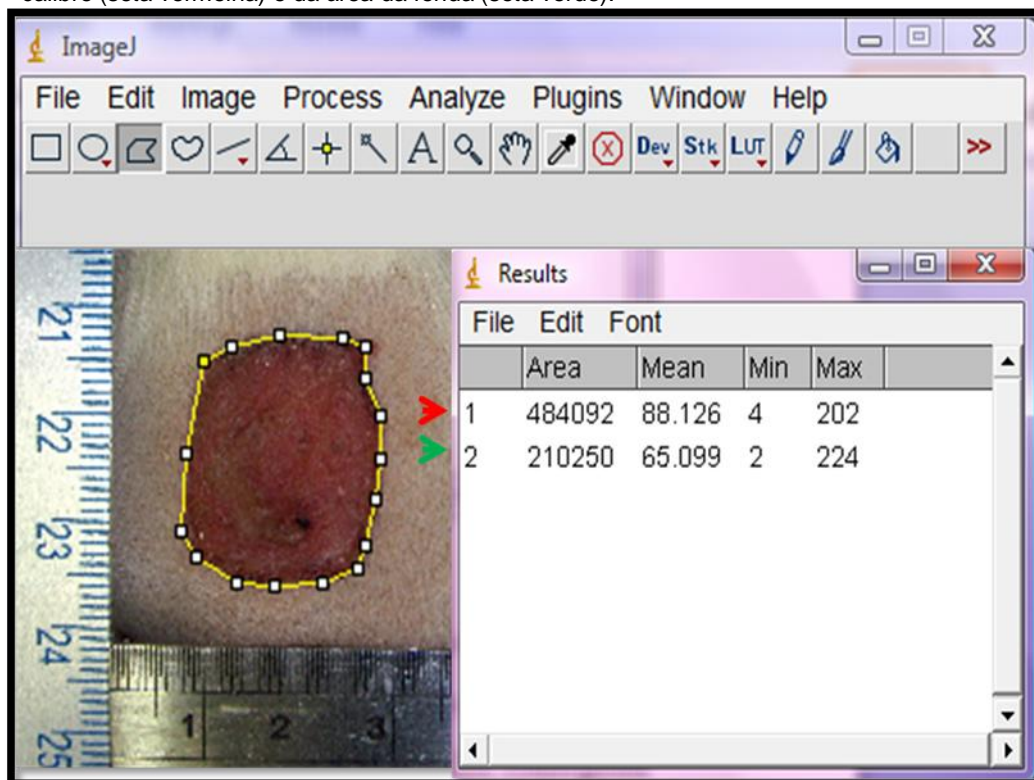


A seguir, com auxílio de um mouse, procedeu-se o contorno manual da imagem, cujo resultado em pixels, corresponderia ao valor da área da ferida (Figura 14). A conversão para a unidade de centímetros quadrados foi conseguida utilizando-se uma regra de três, como pode ser observado abaixo.

$$\text{Área da Ferida (cm}^2\text{)} = \frac{9 \times \text{Área da Ferida (pixels)}}{\text{Área do Calibre (pixels)}}$$

As taxas de contração cicatricial das feridas excisionais foram obtidas subtraindo-se a área cruenta inicial do pós-operatório imediato, em cada animal, pela área cruenta em cada tempo pós-operatório.

FIGURA 14 – Método de cálculo das imagens, e resultados em pixels dos cálculos da área de calibre (seta vermelha) e da área da ferida (seta verde).



3.12 ANÁLISE MICROSCÓPICA

3.12.1 Coloração pela Hematoxilina-Eosina (HE)

Analysaram-se os cortes histológicos através de microscópio óptico *Olympus*[®] (Olympus, Tokyo, Japão). Foram definidos 5 campos, dispostos no tecido de granulação, examinados inicialmente em aumento panorâmico para a identificação dos melhores campos representativos da lesão e, a seguir, foram analisados sob aumento de 400 vezes, dependendo do parâmetro em questão.

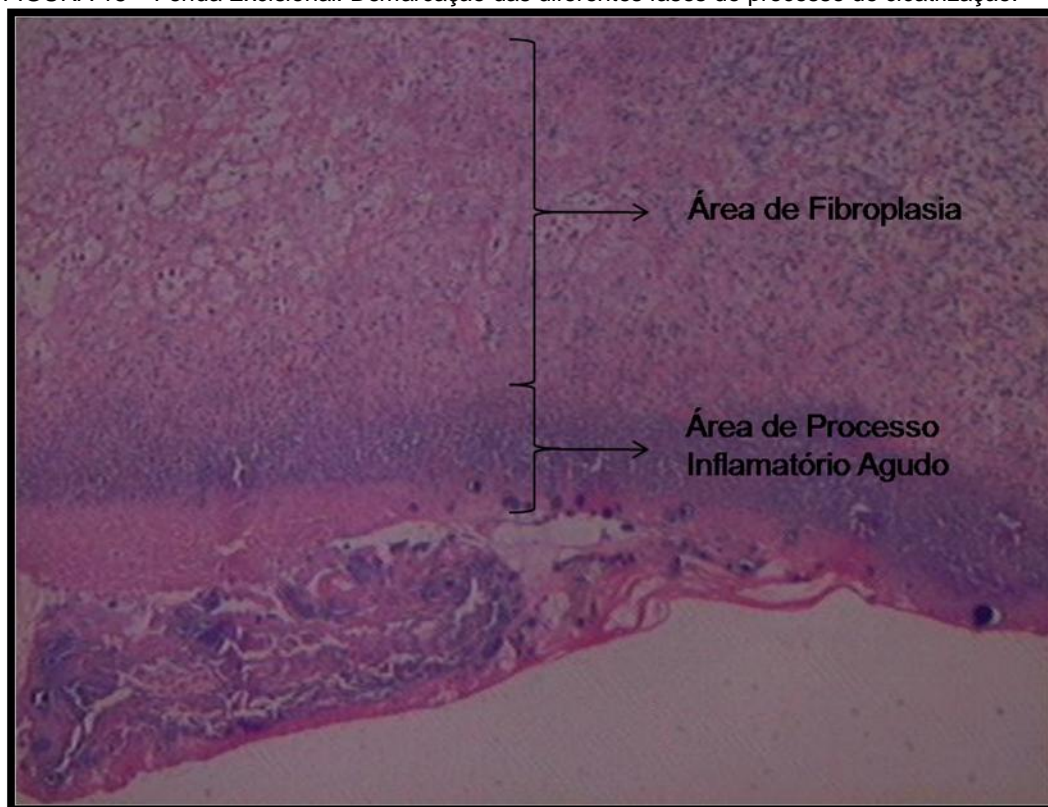
3.12.1.1 Avaliação Microscópica da Reepitelização

A fim de avaliar o grau de reepitelização da epiderme, as feridas dorsais para análise de reepitelização (nomeadas anteriormente) foram avaliadas e foi avaliada a integridade da reepitelização da ferida, ao longo de dos maiores eixos longitudinais e transversais.

3.12.1.2 Avaliação Microscópica Relacionada à Derme

Em todos os animais foram observadas duas áreas bem definidas na região da ferida excisional: uma área mais superficial ainda com predomínio de neutrófilos e reação inflamatória aguda e uma área de processo inflamatório tardio, com predomínio de fibroblastos e escassez de polimorfonucleares e linfócitos (FIGURA 15).

FIGURA 15 – Ferida Excisional. Demarcação das diferentes fases do processo de cicatrização.



Na área de processo inflamatório mais tardio (fibroplasia), foram definidos 5 campos e foi realizada a contagem de fibroblastos e fibrócitos por campo de grande aumento (400 vezes).

3.12.1 Coloração pelo Picrosirius, para Análise Quali e Quantitativa do Colágeno

Uma vez obtidos os segmentos de tecido das feridas excisionais e incisionais, os espécimes foram mantidos em formalina 10% para posterior estudo histológico, o qual foi realizado no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UFPR. O método consistiu na identificação e quantificação das fibras colágenas totais, fibras maduras (tipo I) e fibras imaturas (tipo III) por técnica de microscopia óptica com luz polarizada e análise morfométrica computadorizada. As amostragens macroscópicas foram padronizadas para todos os espécimes, realizando-se

cortes transversais na porção média da ferida incisional e excisional. Após desidratação, diafanização e emblocamento dos tecidos em parafina, foram realizadas microtomias com 4 µm de espessura e subsequente coloração com *picrosirius-red F3BA* (FIGURA 16).

Analísaram-se os cortes histológicos através de microscópio óptico *Olympus*[®] (Olympus, Tokyo, Japão) com fonte de luz polarizada. As imagens foram captadas por uma câmara fotográfica *Sony*[®] CCD *Íris* (Sony, Tokyo, Japão), transmitidas a monitor colorido *Triniton Sony*[®], congeladas e digitalizadas por meio de placas *Oculus TCX*[®]. Finalmente, as imagens foram analisadas pelo aplicativo *Image Pro-Plus*[®] versão 4.5 (Mídia Cibernética, São Paulo, SP, Brasil). Em aumento de 200 vezes, a calibração do sistema foi realizada pela leitura de área cicatricial considerada normal pelo examinador. No sistema RGB (*Red, Blue, Green*) considerou-se valores para as tons de vermelho e laranja (colágeno maduro tipo I) e para tons de verde (colágeno imaturo tipo III) (FIGURA 16). O colágeno total da ferida foi quantificado (quaisquer estruturas com coloração em espectro variando de amarelo, verde a vermelho) e diferenciado da substância amorfa restante do tecido (tons de preto). Todas as análises histológicas foram realizadas num mesmo período, de forma aleatória, sob as mesmas condições de regulação e calibração do aparelho.

Na análise histológica de cada área cicatricial, 5 campos de grande aumento (200 vezes) foram aleatoriamente selecionados para a quantificação dos tipos de colágeno. A média destas 5 análises foi considerada como valor final para cada ferida.

Para a quantificação do colágeno total da ferida, foram analisadas as áreas com coloração diferente da cor preta e foi calculada a porcentagem de áreas com e sem fibras colágenas por campo de grande aumento (200 vezes). Para a quantificação dos colágenos maduro (I) e imaturo (III), em cada campo analisado foi calculada a porcentagem somente das áreas ocupadas por fibras, desconsiderando outras tonalidades e espaços escuros entre as fibras. Assim, a soma da porcentagem de fibras maduras e imaturas em cada amostra totalizou 100%.

FIGURA 16 – Coloração com picosirius-red F3BA. Em A visualização com aumento de 100 vezes. Em B, aumento de 200 vezes, sob luz polarizada.

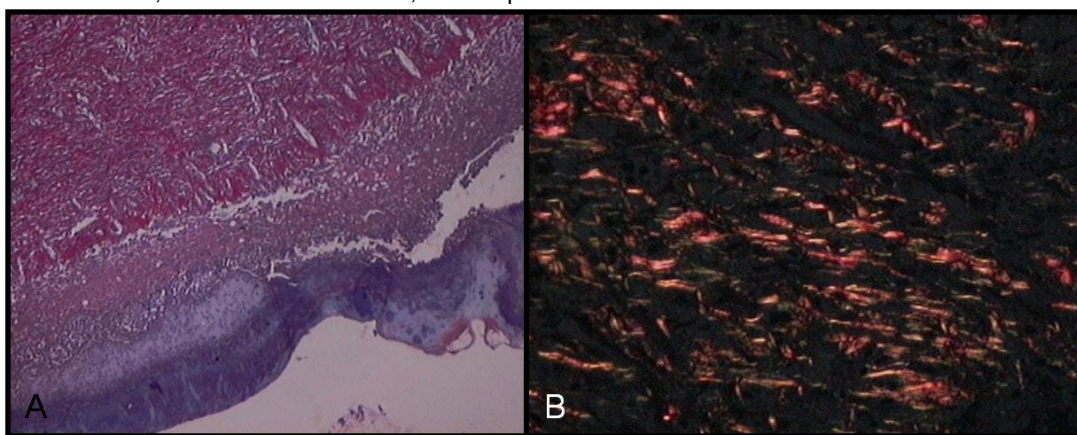
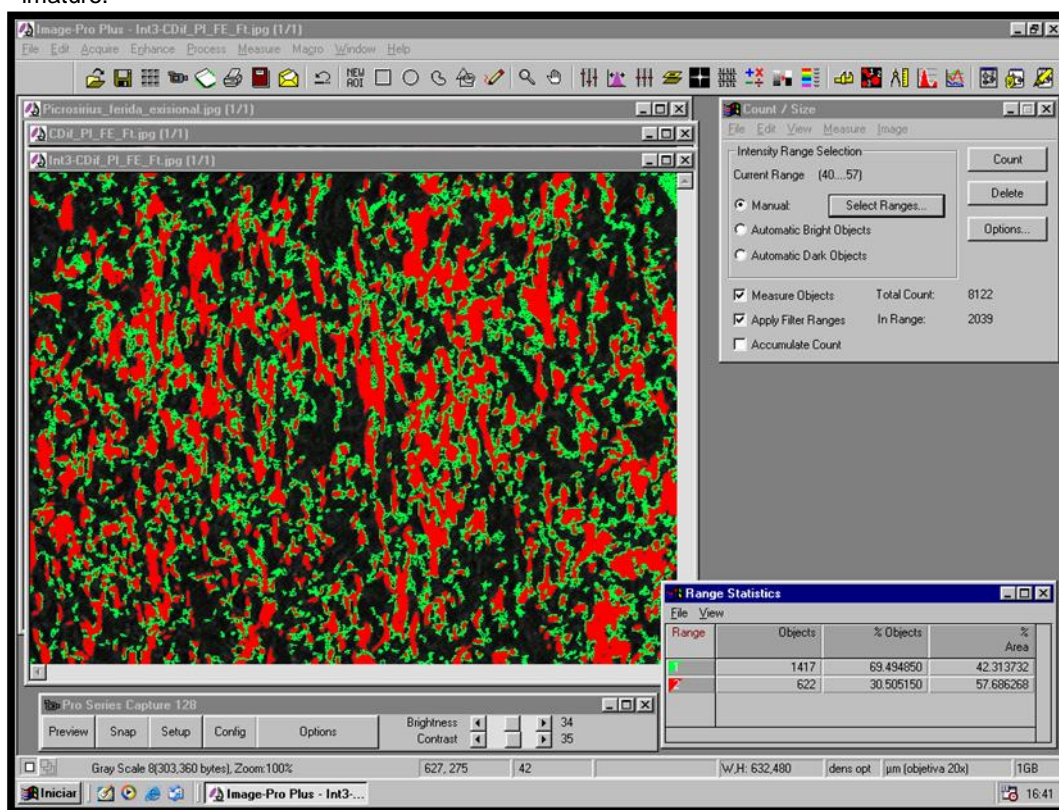


FIGURA 17 – Método de aferição das quantidades de colágeno maduro e de colágeno imaturo.



3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram tabulados em planilha do programa Microsoft Office Excel® (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA).

Para responder aos objetivos de interesse para as medidas de variação do peso corporal dos ratos ao longo do experimento foi utilizada a análise de variâncias com dois fatores (dieta e tempo de observação).

Para as medidas de análise gráfica das feridas (avaliação das áreas cruentas e das taxas de contração), tensiometria (com avaliação das variáveis tensão máxima e força máxima das feridas incisionais), quantificação do colágeno total, maduro e imaturo e contagem diferencial de células à microscopia foi utilizada a análise de variâncias com dois fatores (dieta e tempo de observação). Para a medida da reepitelização celular foi utilizado o teste de qui-quadrado. Para os testes realizados foi utilizado o nível de significância com $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DAS DIETAS E DA INGESTÃO DE ARGININA E IMUNONUTRIENTES

Todos os animais foram alimentados com a mesma dieta própria para roedores e a suplementação (dieta em estudo e dieta controle) eram isocalóricas e isoproteicas.

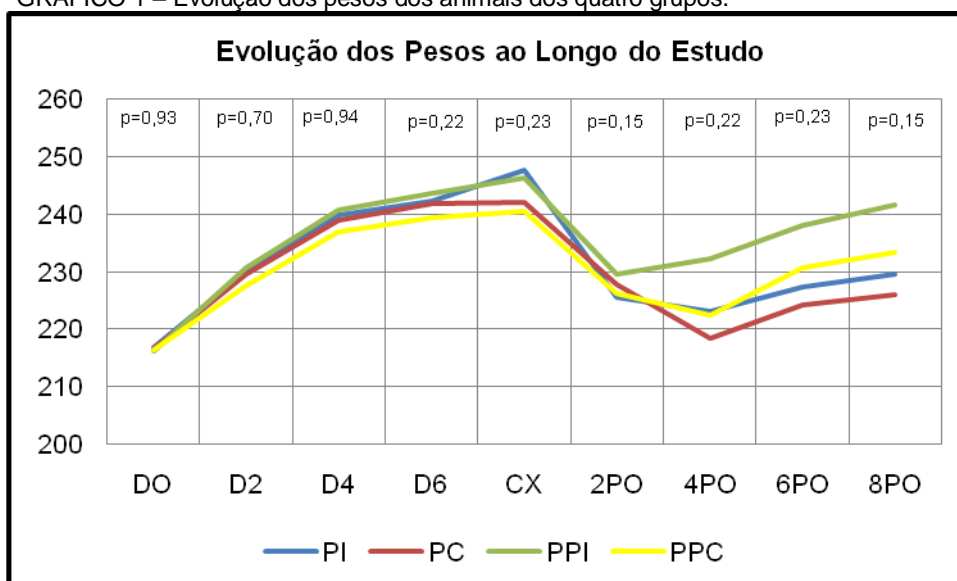
As quantidades dos oligoelementos suplementados - selênio e zinco, foi maior nos grupos estudados (PI e PPI) em comparação aos grupos controle (PC e PPC) devido à ausência de tais substâncias na dieta enteral controle.

Os animais dos grupos de estudo (PI e PPI) receberam, por gavagem, a dose de 0,5 g/Kg/dia de arginina. Os animais dos grupos controle (PC e PCC) receberam por gavagem o mesmo volume da dieta controle, proporcionalmente ao seu peso.

4.2 PESO

O peso ao longo dos períodos pré-operatório até o dia da eutanásia foi semelhante entre os grupos de estudo (PI e PPI) e controles (PC e PPC), não havendo diferença estatística entre os grupos em nenhum momento do estudo ($p > 0,05$), como pode ser observado no Gráfico 1.

GRÁFICO 1 – Evolução dos pesos dos animais dos quatro grupos.



Valores de p obtidos com a análise das variâncias (ANOVA), considerando $p < 0,05$.

Onde: PI – suplementação pré-operatória com a dieta em estudo; PC – suplementação pré-operatória com a dieta padrão; PPI – suplementação pré e pós-operatória com a dieta em estudo; PPC – suplementação pré e pós-operatória com a dieta controle. O D0 corresponde ao primeiro dia do estudo (início da suplementação pré-operatória). Cx é o dia dos procedimentos cirúrgicos.

A perda de peso média dos animais dos grupos de estudo e controles submetidos à cirurgia no 7º dia do experimento foi similar em todos os grupos ($p = 0,12$), como pode ser observado na Tabela 2.

TABELA 2 – Comparação do peso dos animais no pré-operatório, no dia do procedimento cirúrgico e no dia da eutanásia.

Grupos	Peso Pré-op (g) (M ± EP)	Peso Cirurgia (g) (M ± EP)	Peso Eutanásia (M ± EP)	Perda de Peso no PO Imediato(g) (M±EP)
PI	232,27 ± 5,28	247,74 ± 3,86	229,63 ± 4,23	19,21 ± 1,17
PC	231,70 ± 5,74	242,1 ± 5,07	226,03 ± 5,07	13,65 ± 1,33
PPI	232,88 ± 5,79	246,35 ± 5,41	241,71 ± 5,23	16,65 ± 1,38
PPC	230,08 ± 5,44	240,64 ± 4,88	233,46 ± 5,58	14,29 ± 1,44

Onde: M – Valores das Médias. EP –Valores de Erro Padrão. Os valores foram submetidos a análise de variâncias, considerando $p < 0,05$.

4.3 MORBIDADE E MORTALIDADE

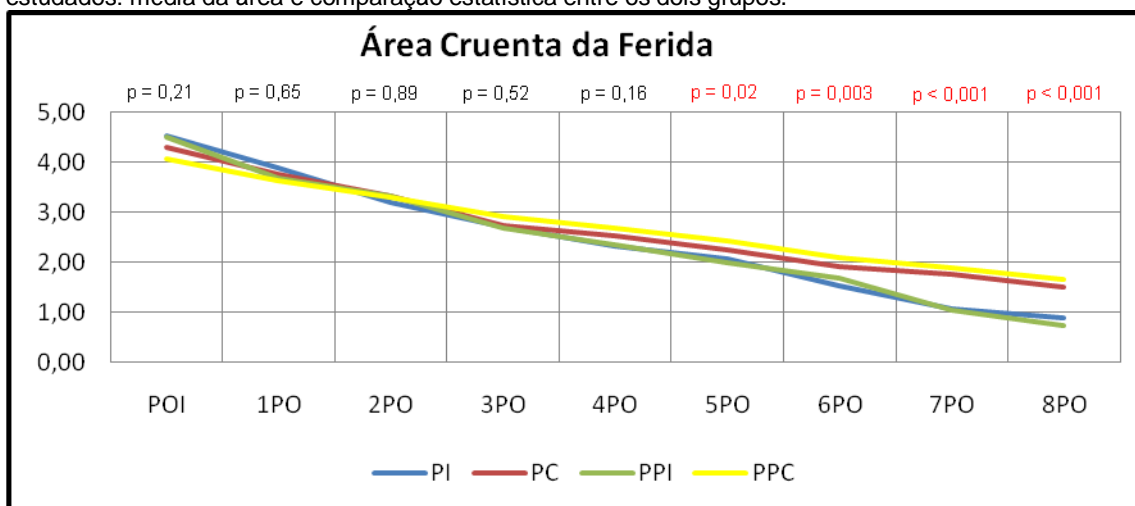
Segundo avaliação clínica, nenhuma ferida incisa apresentou complicações como deiscência, infecção ou hematoma. A maioria das feridas excisionais mostrou-se seca e com crosta sobre a área cruenta. Por

vezes, ausência de crosta e pequena serosidade foi observada na área cruenta. Não ocorreu nenhum caso de óbito durante o curso do estudo.

4.4 AVALIAÇÃO DA CONTRAÇÃO CICATRICIAL

A área cruenta da ferida excisional foi avaliada em diferentes tempos pós-operatórios. A ferida criada no ato cirúrgico foi bastante semelhante entre os dois grupos (PI = 4,52; PC = 4,30; PPI = 4,51; PPC = 4,06), não apresentando diferença estatística entre os grupos ($p > 0,5$). Comparando-se a evolução das áreas cruentas das feridas excisionais, de acordo com a evolução do período pós-operatório, pode-se perceber que, a partir do 5PO as áreas cruentas dos grupos PI e PPI foram significativamente menores ($p < 0,05$) quando comparadas aos grupos controle (PC e PPC), conforme pode ser observado no Gráfico 2.

GRÁFICO 2 – Evolução das áreas cruentas nos grupos PI, PC, PPI e PPC ao longo dos dias estudados: média da área e comparação estatística entre os dois grupos.

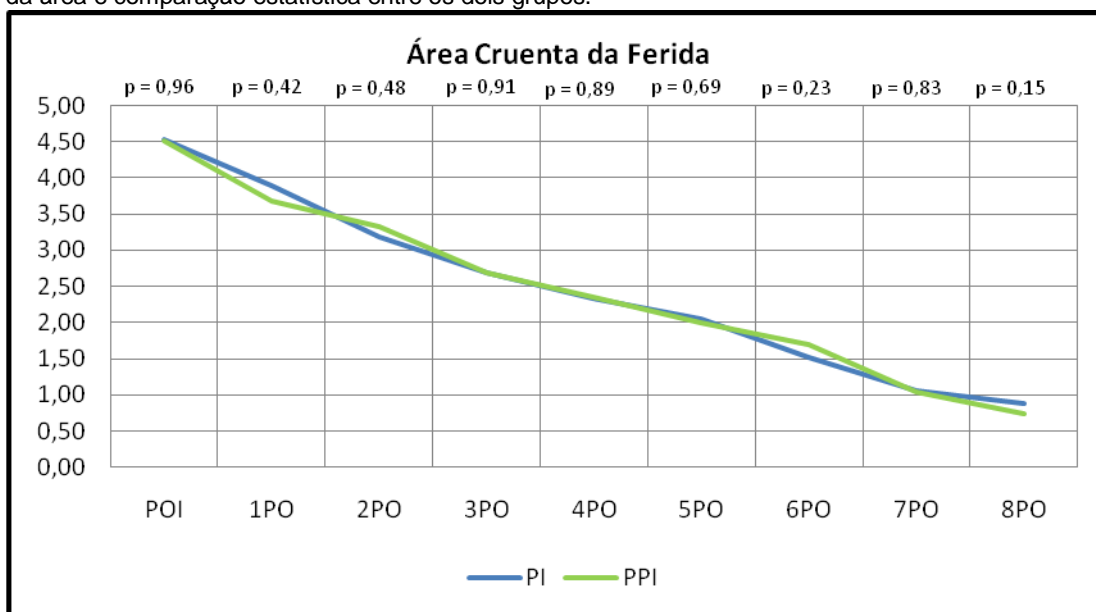


Valores de p obtidos com a análise das variâncias (ANOVA), considerando $p < 0,05$.

Onde: PI – suplementação pré-operatória com a dieta em estudo; PC – suplementação pré-operatória com a dieta padrão; PPI – suplementação pré e pós-operatória com a dieta em estudo; PPC – suplementação pré e pós-operatória com a dieta controle.

As áreas cruentas dos grupos suplementados com a dieta em estudo (PI e PPI) também foram avaliadas, porém não houve diferença estatística nos diferentes tempos de pós-operatório, como pode ser visto no Gráfico 3..

GRÁFICO 3 – Evolução das áreas cruentas nos grupos PI e PPI ao longo dos dias estudados: média da área e comparação estatística entre os dois grupos.

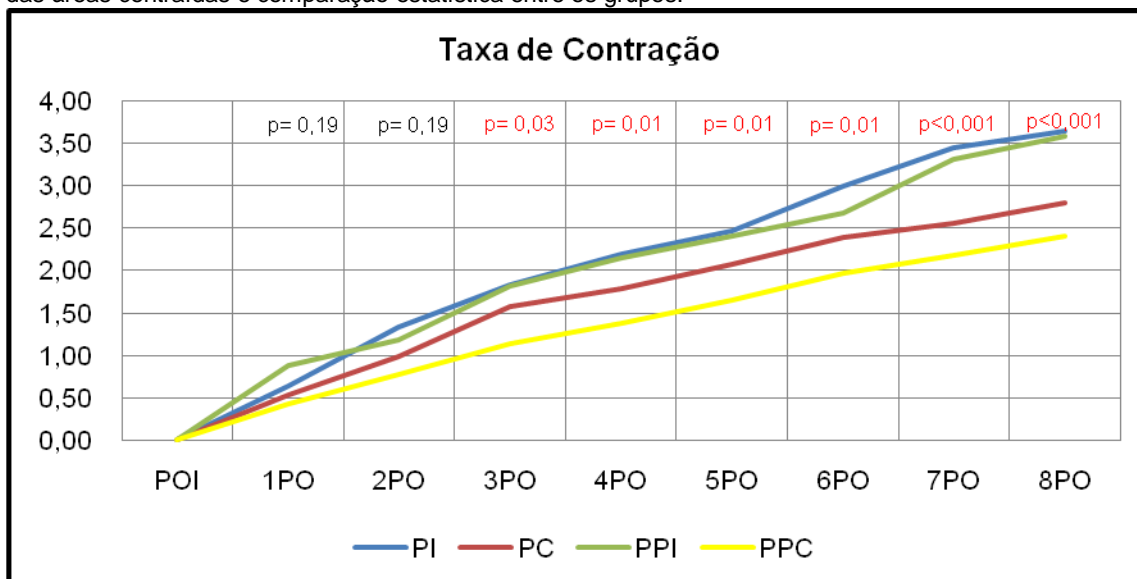


Valores de p obtidos com a análise das variâncias (ANOVA), considerando $p < 0,05$.

Onde: PI – suplementação pré-operatória com a dieta em estudo; PPI – suplementação pré e pós-operatória com a dieta em estudo.

A área contraída nos diferentes tempos pós-operatórios em relação ao pós-operatório imediato teve diferença (com significância estatística a partir do segundo dia pós-operatório) como pode ser observado no Gráfico 4.

GRÁFICO 4 – Taxa de contração nos grupos PI, PC, PPI e PPC nos diferentes dias estudados: média das áreas contraídas e comparação estatística entre os grupos.

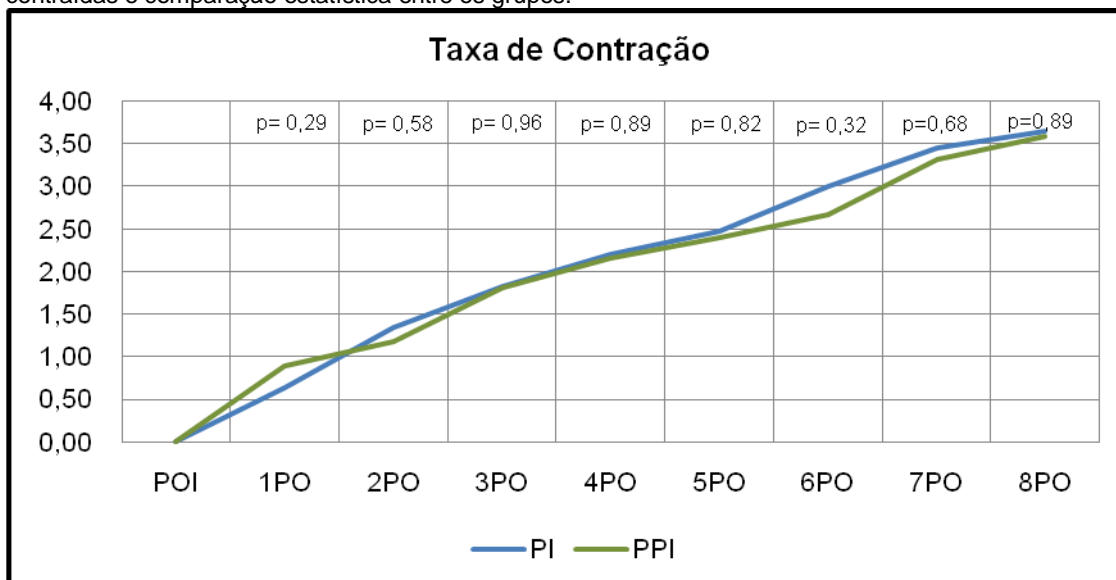


Valores de p obtidos com a análise das variâncias (ANOVA), considerando $p < 0,05$.

Onde: PI – suplementação pré-operatória com a dieta em estudo; PC – suplementação pré-operatória com a dieta padrão; PPI – suplementação pré e pós-operatória com a dieta em estudo; PPC – suplementação pré e pós-operatória com a dieta controle.

Comparando-se as taxas de contração das feridas excisionais nos grupos suplementados com a dieta em estudo, pode-se perceber no Gráfico 5 que não houve diferença estatística entre eles.

GRÁFICO 5 – Taxa de contração nos grupos PI e PPI nos diferentes dias estudados: média das áreas contraídas e comparação estatística entre os grupos.



Valores de p obtidos com a análise das variâncias (ANOVA), considerando $p < 0,05$.

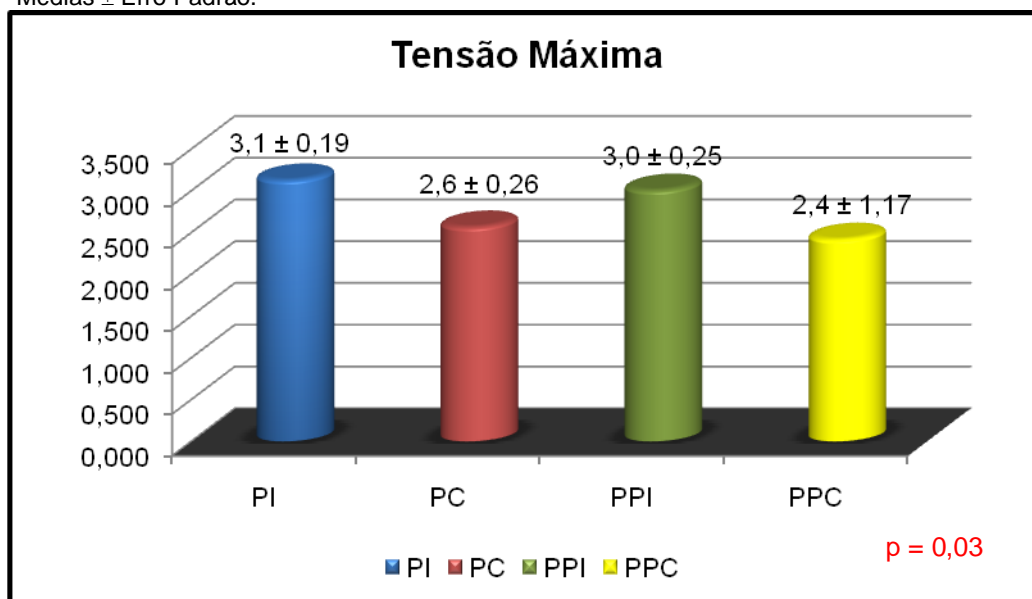
Onde: PI – suplementação pré-operatória com a dieta em estudo; PPI – suplementação pré e pós-operatória com a dieta em estudo.

4.5 AVALIAÇÃO TENSIONOMÉTRICA

4.5.1 Tensão Máxima

O valor médio e de erro padrão da variável “tensão máxima” nos animais sacrificados no 8º dia pós-operatório foi de $3,1 \pm 0,19$ kgf/cm² no grupo PI, $2,6 \pm 0,26$ kgf/cm² no grupo PC, $3,0 \pm 0,25$ kgf/cm² no grupo PPI e $2,4 \pm 1,17$ kgf/cm² no grupo PPC, havendo significância estatística na comparação dos quatro grupos ($p = 0,03$) como pode ser visto no Gráfico 6.

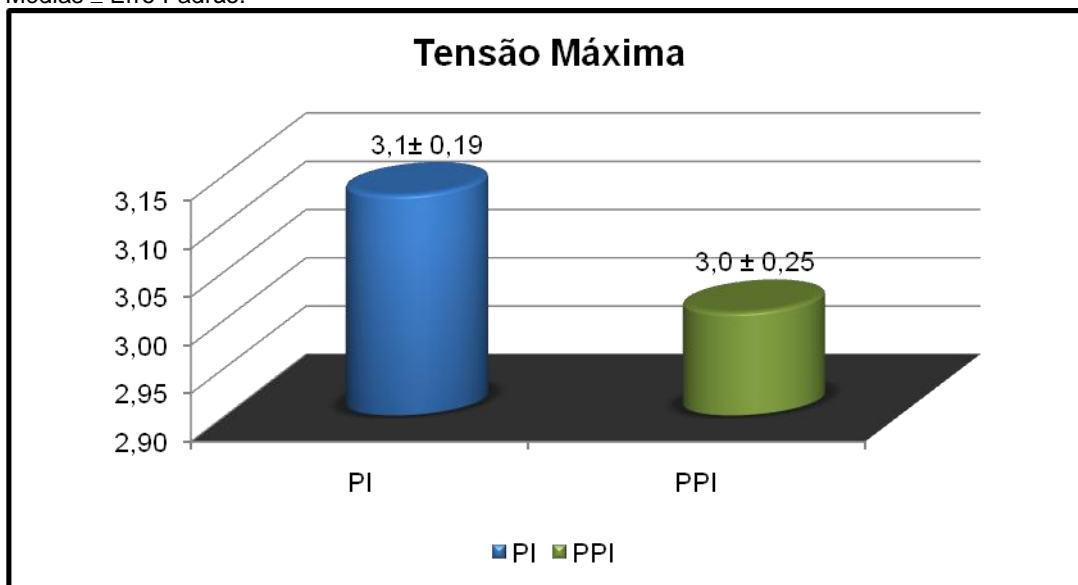
GRÁFICO 6 – Avaliação Tensionométrica, variável tensão máxima nos grupos suplementados com as dietas em estudo (PI e PPI) e nos grupos suplementados com as dietas controles (PC e PPC), no 8º dia pós-operatório. Valores médios \pm erro padrão (kgf/cm²). Médias \pm Erro Padrão.



Valores de p obtidos com a análise das variâncias (ANOVA), considerando $p < 0,05$. Onde: PI – suplementação pré-operatória com a dieta em estudo; PC – suplementação pré-operatória com a dieta padrão; PPI – suplementação pré e pós-operatória com a dieta em estudo; PPC – suplementação pré e pós-operatória com a dieta controle.

Comparando-se os valores de tensão máxima nos grupos suplementados com dieta em estudo, foram observadas diferenças estatística ($p = 0,49$), como pode-se ver no Gráfico 7.

GRÁFICO 7 – Avaliação Tensiométrica, variável tensão máxima nos grupos suplementados com as dietas em estudo (PI e PPI) Valores médios \pm erro padrão (kgf/cm^2). Médias \pm Erro Padrão.



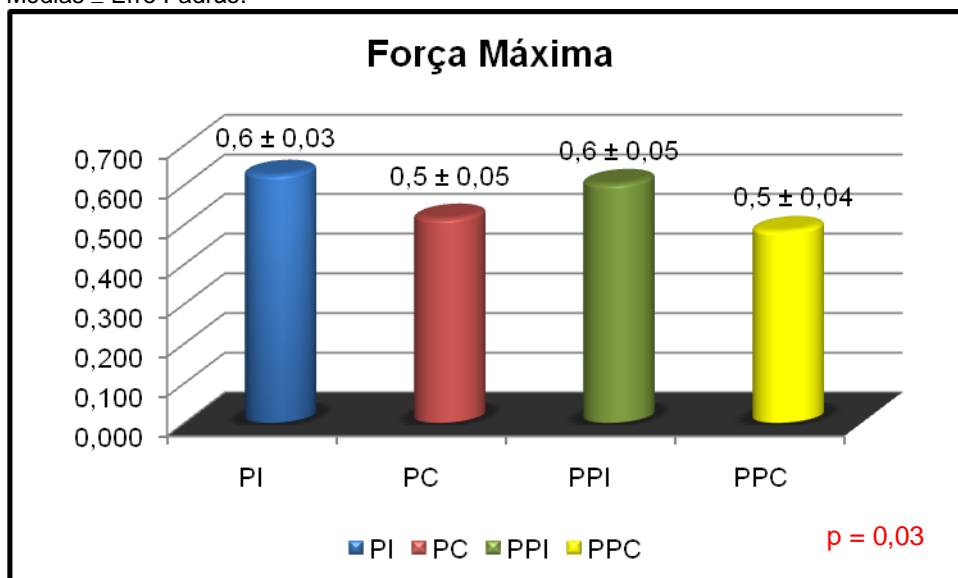
Valor de p obtidos com a análise das variâncias (ANOVA), considerando $p < 0,05$.

Onde: PI – suplementação pré-operatória com a dieta em estudo; PPI – suplementação pré e pós-operatória com a dieta em estudo;

4.5.2 Força Máxima

Quanto à variável “força máxima”, os valores médios e de erro padrão no 8º dia pós-operatório foram $0,614 \pm 0,31$ kgf no grupo PI, $0,5 \pm 0,05$ kgf no grupo PC, $0,6 \pm 0,05$ kgf no grupo PPI e $0,5 \pm 0,04$ kgf no grupo PPC, com diferença estatisticamente significativa entre os quatro grupos ($p = 0,03$), como mostra o Gráfico 8.

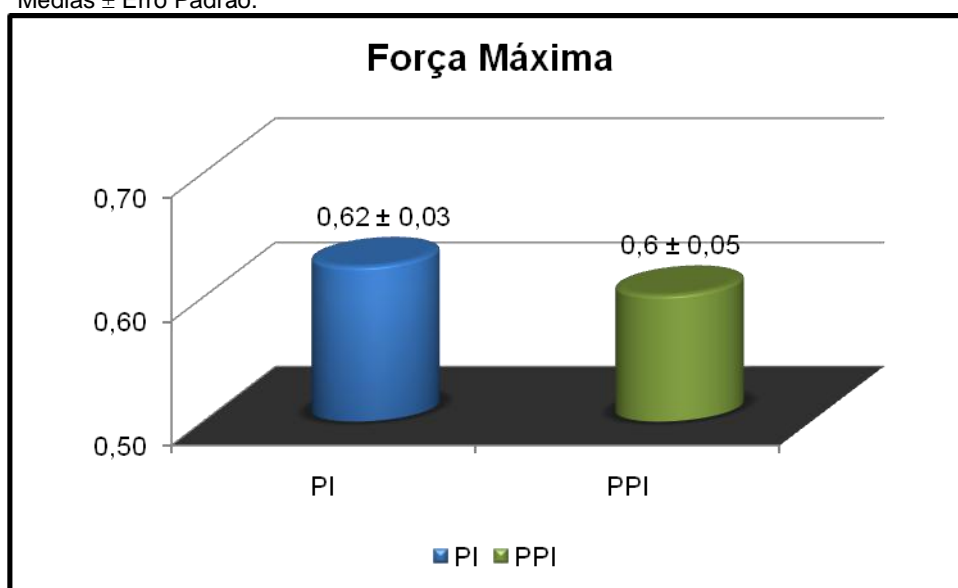
GRÁFICO 8 – Avaliação Tensiométrica, variável força máxima nos grupos suplementados com as dietas em estudo (PI e PPI) e nos grupos suplementados com as dietas controles (PC e PPC), no 8º dia pós-operatório. Valores médios \pm erro padrão (kgf). Médias \pm Erro Padrão.



Valores de p obtidos com a análise das variâncias (ANOVA), considerando $p < 0,05$. Onde: PI – suplementação pré-operatória com a dieta em estudo; PC – suplementação pré-operatória com a dieta padrão; PPI – suplementação pré e pós-operatória com a dieta em estudo; PPC – suplementação pré e pós-operatória com a dieta controle.

Comparando-se os valores de força máxima nos grupos suplementados com dieta em estudo, não obtivemos diferenças estatística ($p = 0,49$), como pode-se ver no Gráfico 9.

GRÁFICO 9 - Avaliação Tensiométrica, variável tensão máxima nos grupos suplementados com as dietas em estudo (PI e PPI). Valores médios \pm erro padrão (kgf). Médias \pm Erro Padrão.



Valores de p obtidos com a análise das variâncias (ANOVA), considerando $p < 0,05$.

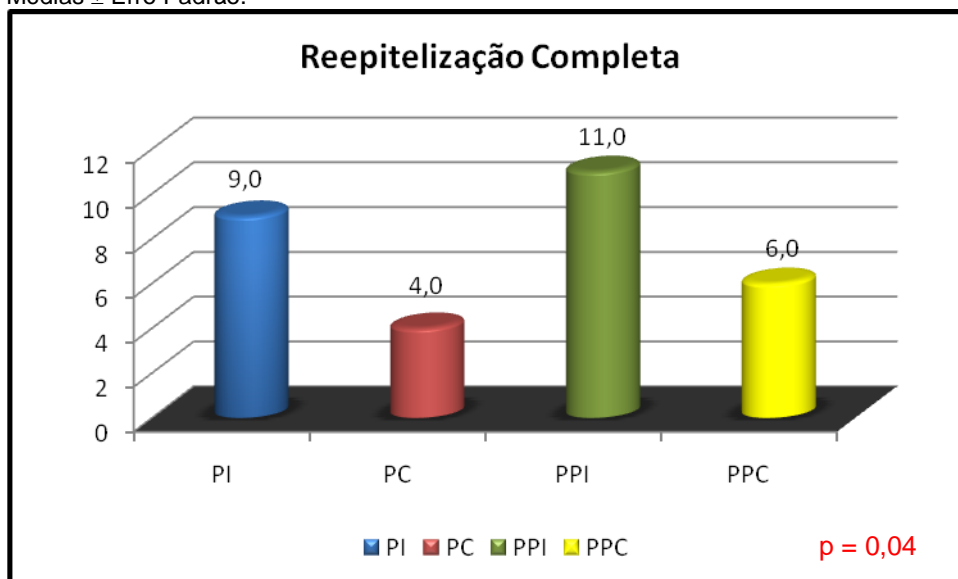
Onde: PI – suplementação pré-operatória com a dieta em estudo; PPI – suplementação pré e pós-operatória com a dieta em estudo.

4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

4.6.1 Avaliação Microscópica da Reepitelização

O estudo da epitelização das feridas cutâneas mostrou que os grupos PI e PPI tiveram maior taxa de reepitelização completa (Figura 17) quando comparados aos grupos controles (PC e PPC), com significância estatística ($p = 0,04$), como pode ser visto no Gráfico 10. A comparação das taxas de reepitelização entre os grupos em estudo (PI e PPI) não mostrou diferença ($p = 0,25$).

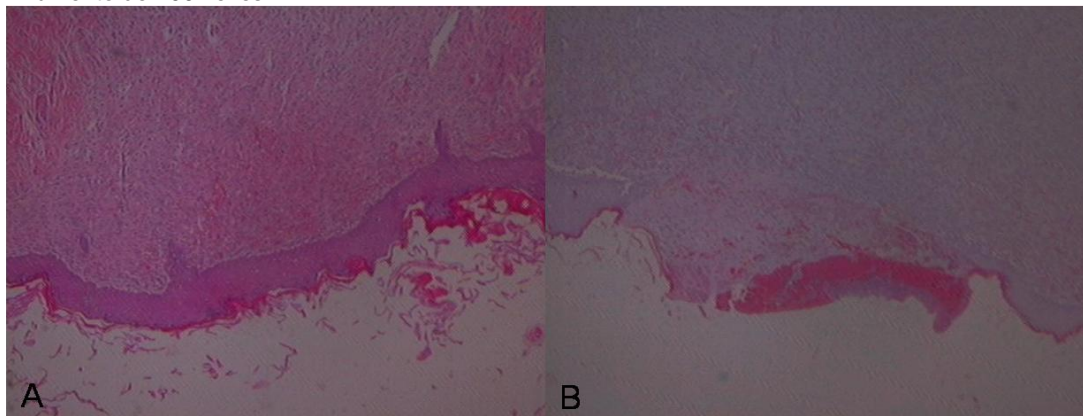
GRÁFICO 10 – Avaliação da presença de reepitelização completa das feridas cutâneas. Médias \pm Erro Padrão.



Valores de p obtidos com o teste de Chi-quadrado, considerando $p < 0,05$.

Onde: PI – suplementação pré-operatória com a dieta em estudo; PC – suplementação pré-operatória com a dieta padrão; PPI – suplementação pré e pós-operatória com a dieta em estudo; PPC – suplementação pré e pós-operatória com a dieta controle.

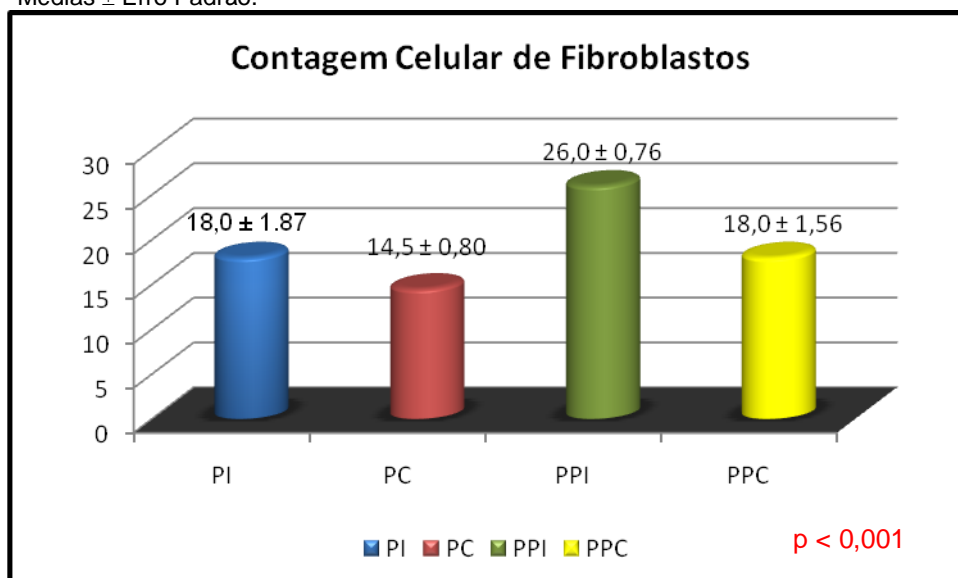
FIGURA 17 – Exemplos de: em A - Reepitelização Completa. Em B - Reepitelização Incompleta. Aumento de 100 vezes.



4.6.2 Avaliação Microscópica Relacionada à Derme

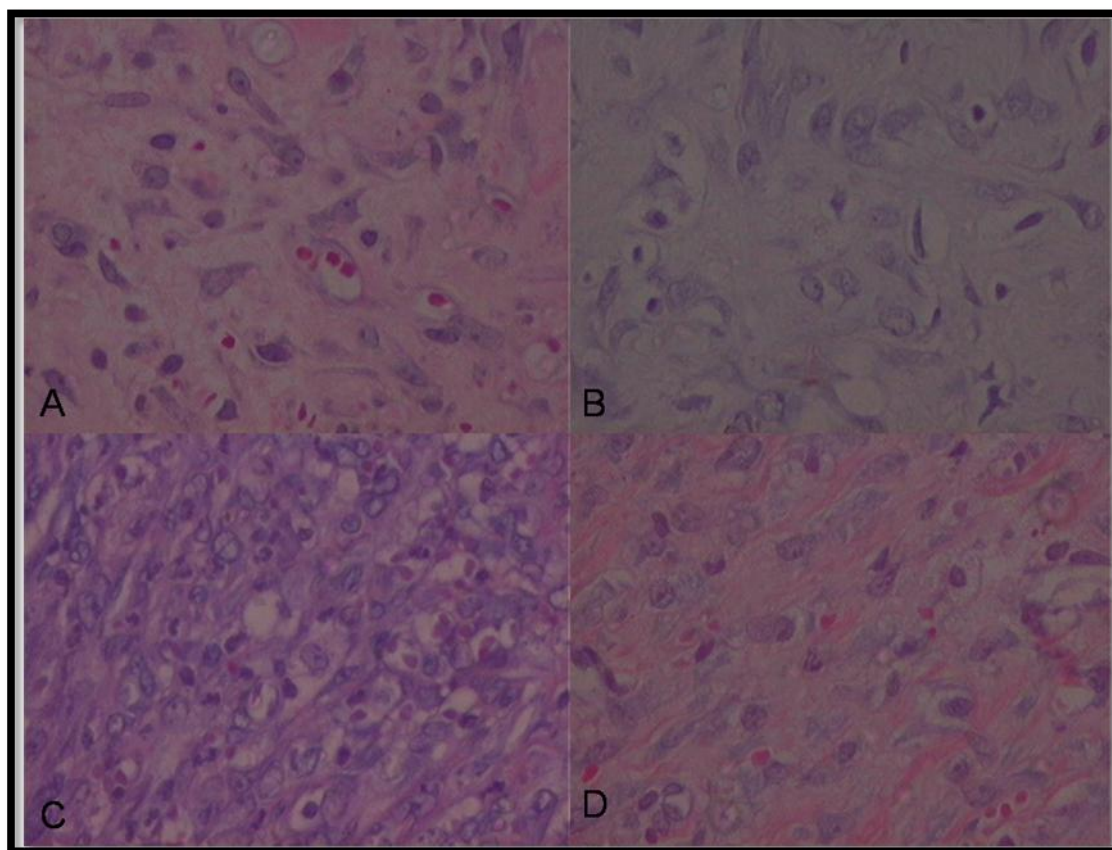
A quantidade de fibroblastos por campo de grande aumento foi significativamente maior no grupo PPI ($p < 0,001$), como pode ser visto no Gráfico 11 e Figura 18. Observam-se também os valores de média \pm erro padrão nos diferentes grupos.

GRÁFICO 11 – Avaliação da contagem de fibroblastos na derme em regeneração. Médias \pm Erro Padrão.



Valores de p obtidos com a análise das variâncias (ANOVA), considerando $p < 0,05$. Onde: PI – suplementação pré-operatória com a dieta em estudo; PC – suplementação pré-operatória com a dieta padrão; PPI – suplementação pré e pós-operatória com a dieta em estudo; PPC – suplementação pré e pós-operatória com a dieta controle.

FIGURA 18 – Exemplos de: Em A - Contagem de células na derme grupo PI; em B - Contagem de células na derme grupo PC; em C - Contagem de células na derme grupo PPI; em D - Contagem de células na derme grupo PPC.



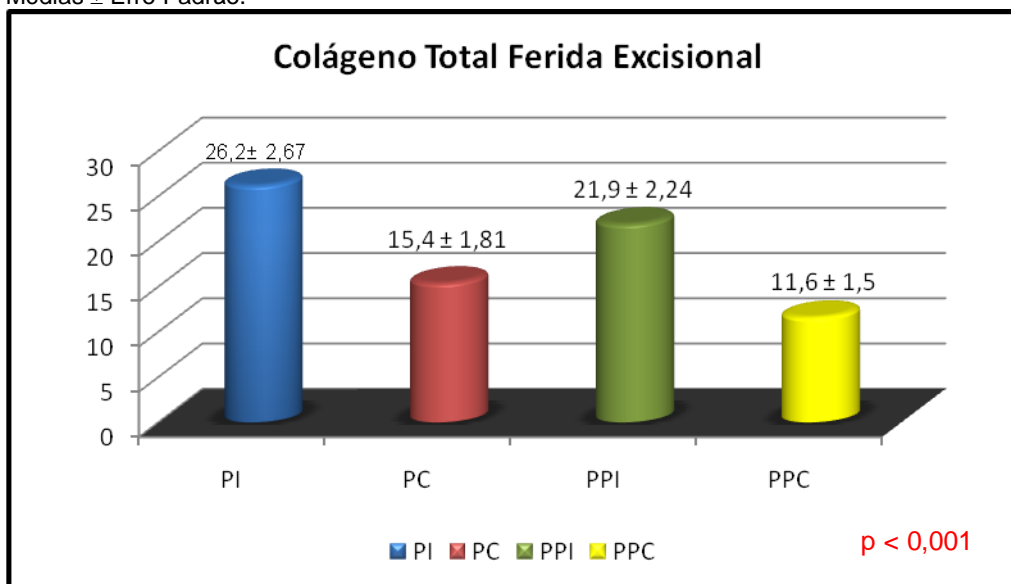
4.6.3 Quantificação do Colágeno Total

4.6.3.1 Quantidade de Colágeno Total da Ferida Excisional

A quantidade de colágeno total da ferida excisional, medida nos grupos suplementados com a dieta em estudo e nos tratados com a dieta controle pode ser observada no Gráfico 12. A comparação estatística da quantidade de colágeno total nos quatro grupos (PI, PC, PPI e PPC) mostrou haver

diferença estatística (com valor de $p < 0,001$). A comparação entre os grupos suplementados com a dieta em estudo não mostrou nível de significância estatística ($p = 0,11$).

GRÁFICO 12 – Avaliação da quantidade total de colágeno das feridas excisionais dos quatro grupos estudados.
Médias \pm Erro Padrão.

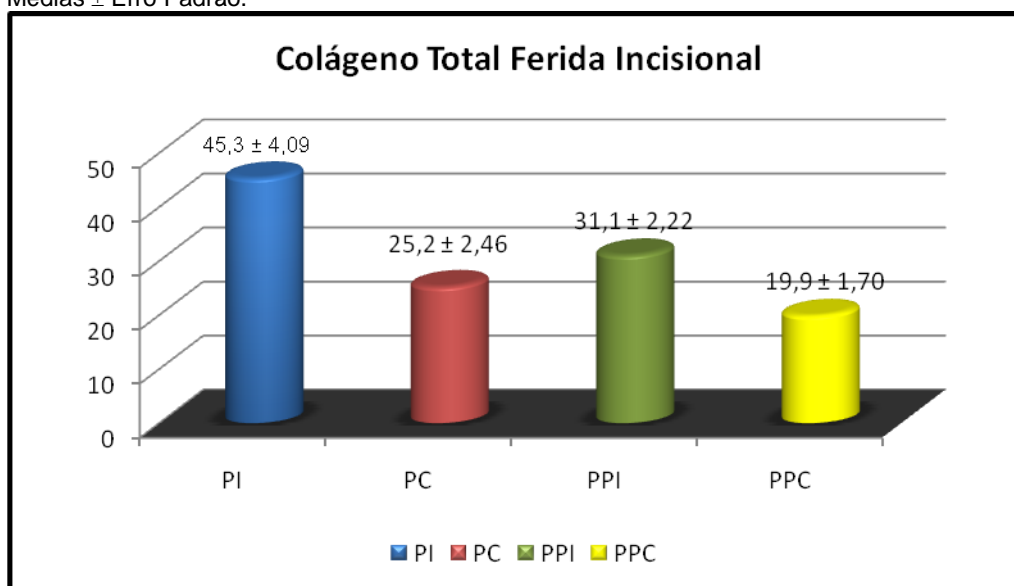


Valores de p obtidos com a análise das variâncias (ANOVA), considerando $p < 0,05$.
Onde: PI – suplementação pré-operatória com a dieta em estudo; PC – suplementação pré-operatória com a dieta padrão; PPI – suplementação pré e pós-operatória com a dieta em estudo; PPC – suplementação pré e pós-operatória com a dieta controle.

4.6.3.2 Quantidade de Colágeno Total da Ferida Incisional

A quantidade de colágeno total da ferida incisional medida nos grupos suplementados com a dieta em estudo e nos tratados com a dieta controle pode ser observada no Gráfico 13. A comparação estatística da quantidade de colágeno total nos quatro grupos (PI, PC, PPI e PPC) mostrou haver diferença estatística ($p < 0,001$). A comparação entre os grupos suplementados com a dieta em estudo não mostrou nível de significância estatística ($p = 0,11$).

GRÁFICO 13 – Avaliação da quantidade total de colágeno das feridas incisionais dos quatro grupos estudados.
Médias \pm Erro Padrão.



Valores de p obtidos com a análise das variâncias (ANOVA), considerando $p < 0,05$.

Onde: PI – suplementação pré-operatória com a dieta em estudo; PC – suplementação pré-operatória com a dieta padrão; PPI – suplementação pré e pós-operatória com a dieta em estudo; PPC – suplementação pré e pós-operatória com a dieta controle.

4.6.4 Qualificação do Colágeno

As médias e erros padrões referentes às quantidades de colágeno tipo I e tipo III podem ser observadas na Tabela 3.

TABELA 3 – Valores (em porcentagem) das quantidades de colágeno maduro (tipo I) e imaturo (tipo III) nas feridas excisionais e incisionais dos quatro grupos estudados.

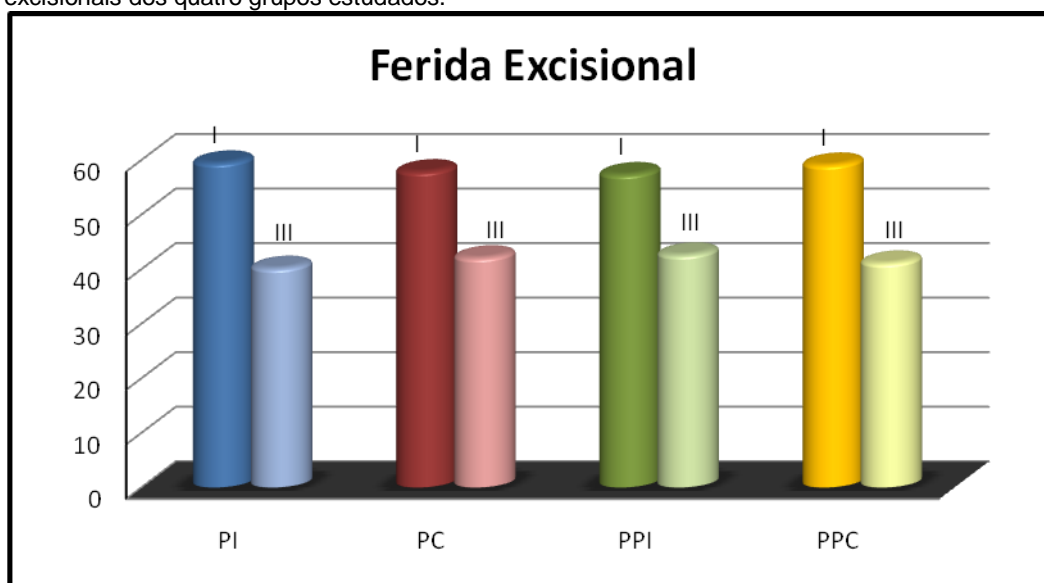
	PI	PC	PPI	PPC
Colágeno I Ferida Excisional	59,47 \pm 0,93	57,87 \pm 1,76	57,35 \pm 1,22	59,1 \pm 1,67
Colágeno III Ferida Excisional	40,18 \pm 0,9	42,09 \pm 1,96	42,63 \pm 1,22	41,13 \pm 1,67
Colágeno I Ferida Incisional	64,66 \pm 1,19	60,66 \pm 1,46	60,25 \pm 1,18	63,35 \pm 1,55
Colágeno III Ferida Incisional	35,27 \pm 1,21	39,32 \pm 1,46	39,56 \pm 1,16	36,62 \pm 1,55

Onde: PI – suplementação pré-operatória com a dieta em estudo; PC – suplementação pré-operatória com a dieta padrão; PPI – suplementação pré e pós-operatória com a dieta em estudo; PPC – suplementação pré e pós-operatória com a dieta controle.

4.6.4.1 Qualificação dos Colágenos Maduro (tipo I) e Imaturo (tipo III) nas Feridas Excisionais

A qualificação do tipo de colágeno presente nas feridas excisionais foi realizada nos quatro grupos estudados, como pode ser observado no Gráfico 14. A comparação estatística das quantidades de colágeno maduro (tipo I) e imaturo (tipo III) nos quatro grupos (PI, PC, PPI e PPC) não mostrou diferenças estatísticas ($p=0,44$ para as comparações das quantidades de colágeno tipo I e $p=0,38$ para as comparações das quantidades de colágeno tipo III).

GRÁFICO 14 – Avaliação das quantidades de colágeno maduro e imaturo das feridas excisionais dos quatro grupos estudados.



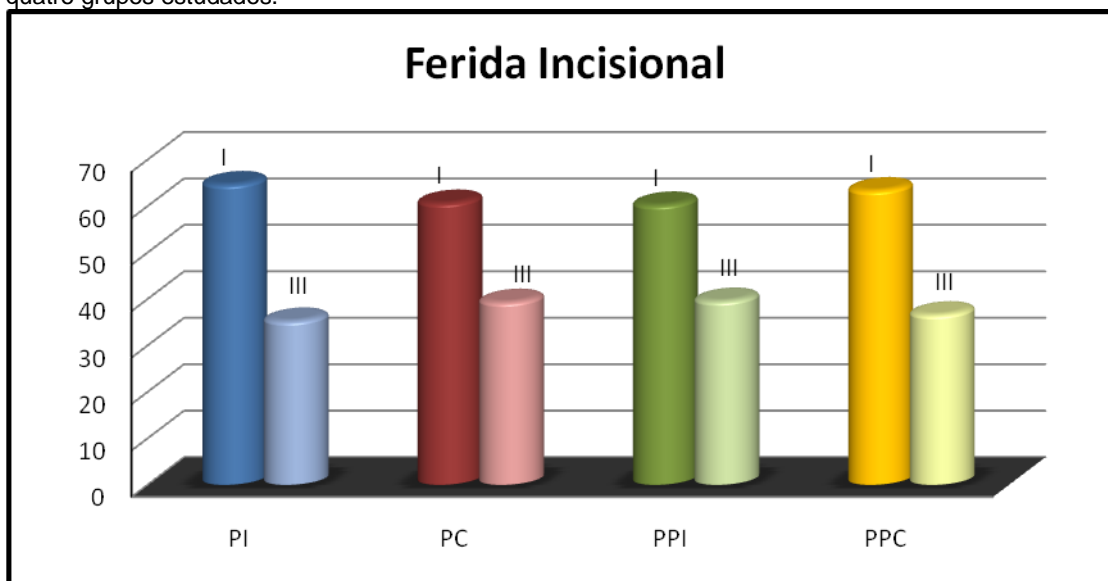
Valores de p obtidos com a análise das variâncias (ANOVA), considerando $p < 0,05$.

Onde: PI – suplementação pré-operatória com a dieta em estudo; PC – suplementação pré-operatória com a dieta padrão; PPI – suplementação pré e pós-operatória com a dieta em estudo; PPC – suplementação pré e pós-operatória com a dieta controle

4.6.4.2 Qualificação dos Colágenos Maduro (tipo I) e Imaturo (tipo III) nas Feridas Incisionais

A qualificação do tipo de colágeno presente nas feridas incisionais foi realizada nos quatro grupos estudados, como pode ser observado no Gráfico 15. A comparação estatística das quantidades de colágeno maduro (tipo I) e imaturo (tipo III) nos quatro grupos (PI, PC, PPI e PPC) não mostrou diferenças estatísticas ($p=0,13$) para as comparações das quantidades de colágeno tipo I e $p=0,13$ para as comparações das quantidades de colágeno tipo III).

GRÁFICO 15 – Avaliação das quantidades de colágeno maduro e imaturo das feridas incisionais dos quatro grupos estudados.



Valores de p obtidos com a análise das variâncias (ANOVA), considerando $p < 0,05$.

Onde: PI – suplementação pré-operatória com a dieta em estudo; PC – suplementação pré-operatória com a dieta padrão; PPI – suplementação pré e pós-operatória com a dieta em estudo; PPC – suplementação pré e pós-operatória com a dieta controle

4.7 RESUMO DOS RESULTADOS

Para melhor interpretação, a Tabela 4 apresenta um resumo dos resultados obtidos.

TABELA 4 – Resumo dos resultados obtidos.

Variáveis	Grupos				Nível p
	PI	PC	PPI	PPC	
Peso	=	=	=	=	NS
Área Cruenta das Feridas Excisionais	↓↓	↓	↓↓	↓	S (p < 0,05)
Taxa de Contração das Feridas Excisionais	=		=		NS
Tensão Máxima	↑↑	↑	↑↑	↑	S (p < 0,05)
Força Máxima	=		=		NS
Reepitelização	++	+	++	+	S (p = 0,03)
Contagem de Fibroblastos	=		=		NS
Colágeno Total	++	+	++	+	S (p = 0,04)
Diferenciação Colágeno nas Feridas Excisionais	=		=		NS
Diferenciação Colágeno Incisionais	+	+	++	+	S (p < 0,001)
	++	+	++	+	S (p < 0,001)
	=		=		NS
	=	=	=	=	NS
	=	=	=	=	NS

Onde: S- com significância estatística, e $p < 0,05$. NS – Sem significância estatística.

5. DISCUSSÃO

5.1 DOS MÉTODOS

O rato foi o animal escolhido pois apresenta características biológicas facilitadoras como facilidade de manuseio e acompanhamento, tem resistência à manipulação, baixo custo e tem sido amplamente utilizado em pesquisas que investigaram a influência da nutrição sobre os mais variados aspectos do metabolismo corporal.

O processo de cicatrização experimental de feridas cutâneas tem sido amplamente utilizado visando melhor conhecimento do reparo tecidual em humanos, porém é necessário cautela na interpretação dos resultados, devido principalmente às diferenças fundamentais entre animais e seres humanos (BROWN, 1995).

De forma experimental, os métodos para avaliação do processo cicatricial podem ser divididos em três grupos: determinação da força necessária para rompimento de tecidos cicatrizados, observação do índice de fechamento das feridas e a quantificação de um dado evento durante o processo de reparo (GOODSON, 1987).

Os modelos que se utilizam de feridas abertas permitem o estudo dos principais mecanismos envolvidos na cicatrização, dentre eles a contração, a reepitelização e a formação do tecido de granulação, permitindo o estudo das diversas estruturas celulares responsáveis por cada um dos processos acima mencionados (GALIANO *et al.*, 2004).

No presente estudo, a confecção de três tipos diferentes de lesões cutâneas anteriormente denominadas (excisionais, incisionais e de reepitelização) permitiu a redução do número de ratos no experimento, pois em cada animal foi possível a avaliação de diferentes fenômenos biológicos da cicatrização cutânea.

A aferição do peso é parâmetro nutricional importante em vários estudos experimentais (KARAHASANOGLU *et al.*, 1998), estando relacionado a alterações cicatriciais. O peso foi um dos parâmetros importantes utilizados em nosso estudo para avaliar a evolução nutricional dos grupos suplementados ao longo do estudo.

Foi realizada a suplementação pré-operatória por período de 7 dias antes do procedimento cirúrgico. O período de 7 dias de nutrição foi baseado nos trabalhos pesquisados que mostraram que a nutrição enteral por 7 a 10 dias no pré-operatório reduz a incidência de complicações pós-operatórias (DETSKY *et al.*, 1987; KLEIN *et al.*, 1997).

De acordo com Hendricks e Mastboom (1990), a investigação da cicatrização necessita de processos de quantificação. Os principais parâmetros utilizados são: clínicos, mecânicos, bioquímicos e histológicos. A preferência é pela utilização do método mecânico, bioquímico ou combinação de ambos (HENDRIKS, MASTBOOM, 1990).

No presente estudo, optamos pela utilização de parâmetros clínicos, método mecânico (força tênsil) e método histológico (utilização de polarização para densitometria do colágeno, e análise microscópica com avaliação da reepitelização das feridas e contagem celular da derme em reconstituição).

Durante muitos anos a análise do colágeno se resumiu à análise da quantificação de hidroxiprolina (aminoácido característico da proteína colágena na maioria dos tecidos). Entretanto, vale ressaltar que vários tipos de colágeno apresentam quantidades diferentes de hidroxiprolina. Um exemplo são as cadeias alfa do colágeno tipo III (imaturo) que apresentam mais resíduos de hidroxiprolina do que as cadeias alfa de colágeno tipo I (maduro) (MILLER, GAY, 1982).

Recentemente, maior ênfase tem sido dada ao uso de métodos qualitativos de avaliação do colágeno (HENDRIKS, MASTBOOM, 1990; RABAU *et al.*, 1998). A coloração de picrossírius com microscopia polarizada diferencia as fibras colágenas de acordo com sua birrefringência; as fibras de maior espessura (colágeno tipo I) aparecem fortemente birrefringentes e as fibras de menor espessura (colágeno tipo III) aparecem fracamente birrefringentes. Esta diferenciação de cores permite a análise qualitativa das

fibras colágenas, obtendo-se a densitometria de fibras maduras (colágeno tipo I) e imaturas (colágeno tipo III) que, em última análise, reflete a proporção de entrelaçamento das fibras ((SWEAT *et al.*, 1964; JUNQUEIRA *et al.*, 1978)

5.2 DOS RESULTADOS

No presente estudo não foram observadas complicações pós-operatórias (como deiscência, infecção ou hematoma) nem tanto óbito dos animais. A realização de estudo piloto , prévio ao início do estudo, para treinamento de todos os passos do trabalho pode ter influenciado positivamente (AHUMADA *et al.*, 2008). Além disso a experiência na linha de pesquisa em cicatrização de órgãos e tecidos, do Programa de Pós-Graduação da UFPR, também trouxe benefícios e teve influência nos resultados.

A variável peso não foi diferente em nenhum grupo (tanto os suplementados com a dieta em estudo quanto os suplementados com a dieta controle) durante os vários tempos do experimento. Tal fato está de acordo com a literatura que mostra que a nutrição perioperatória não é superior à pré-operatória no quesito peso, quando se trata de grupos sem déficits nutricionais (GIANOTTI *et al.*, 2002).

O processo de cicatrização tem início no momento da ruptura tecidual, com a fase inflamatória (PHILLIPS, 2000). A reepitelização também se inicia precocemente e segue até o fechamento completo da ferida. Além disso representa uma sequência de eventos que envolvem migração e proliferação de células epiteliais adjacentes ao local da ferida. No presente experimento houve maior número de animais com reepitelização completa da ferida nos grupos suplementados com a dieta em estudo (grupos PI e PPI). Devido ao fato de a reepitelização ser influenciada por diversos fatores, dentre eles uma maior expressão gênica do fator de crescimento de queratinócitos, esta deverá ser uma variável a ser estudada em

experimentos posteriores na linha de pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da UFPR.

O tecido de granulação é composto por uma matriz composta de fibroblastos, células inflamatórias e vasos sanguíneos. Os fibroblastos produzem grande variedade de substâncias importantes no processo cicatricial. Durante o 2º e 3º dias pós-trauma, os fibroblastos agem principalmente na proliferação e migração celular (SINGER & CLARK, 1999). No presente experimento foi observado maior número de fibroblastos no grupo suplementados com a dieta em estudo (grupo PPI), o que pode sugerir que em tal grupo, no 8º dia pós trauma, a fase de proliferação celular está mais adiantada do que nos grupos suplementados com a dieta controle (PC e PPC) ou suplementado com a dieta em estudo somente no pré-operatório.

A contração da ferida é responsável por reduzir a área da ferida. A análise das áreas cruentas das feridas excisionais mostrou haver maior taxa de contração levando a valores menores de área cruenta no grupos suplementados com a dieta em estudo. Porém não houve diferença estatística no que concerne ao fechamento das feridas, comparando-se os grupos suplementados com a dieta em estudo, de forma pré-operatória e peri-operatória (grupos PI e PPI respectivamente).

O miofibroblasto é a principal célula responsável pela contração da ferida. Presente no tecido de granulação, é o principal tipo celular envolvido no reparo tecidual através da deposição de componentes da matriz extracelular (tenascina, fibronectina, metaloproteinases e colágenos I e III) (ZHANG *et al.*, 1994). As melhores taxas de fechamento das feridas excisionais dos grupos suplementados com a dieta em estudo pode ter relação com o número e/ou o aumento da função dos miofibroblastos. Tal afirmativa deverá ser avaliada em fase posterior a esse estudo experimental.

Quanto ao tipo de teste realizado para avaliar a resistência mecânica das cicatrizes, o método tensiométrico, freqüentemente descrito na literatura (GOTTRUP *et al.*, 2000; DORSETT-MARTIN, 2004) foi utilizado no 8º dia de pós-operatório. Apesar de não ter sido demonstrado diferença estatística na quantidade de fibras maduras e imaturas entre os diferentes grupos, as variáveis de tensão máxima e força máxima mostraram maior resistência

tênsil da pele cicatrizada dos animais suplementados com a dieta em estudo, provavelmente pela maior quantidade de colágeno total das feridas nestes grupos (PI e PPI).

A quantidade de colágeno total apresenta seu primeiro pico de produção por volta o 7º dia após a lesão, continuando em ascensão até o 14º dia e, após, com o decorrer da fase de remodelamento, é estabelecido um equilíbrio entre a síntese e a degradação das fibras colágenas (STADELMANN *et al.*, 1998). No presente experimento foi observada maior quantidade do colágeno total das feridas excisionais dos grupos PI e PPI, mostrando que os grupos suplementados com a dieta em estudo apresenta-se em fase mais adiantada do processo de fechamento da lesão. A comparação entre as quantidades de colágeno total entre os grupos suplementados com a dieta em estudo de forma pré e pré e pós-operatória (grupos PI e PPI) não mostrou diferença estatística.

A produção tanto do colágeno tipo I quanto do tipo III é regulada pela expressão gênica de mRNA dos respectivos colágenos e, com o avanço do processo de cicatrização cutânea, passa a haver uma maturação do colágeno e predominância do colágeno tipo I. No presente experimento, não foi observada diferença estatística entre os grupos estudados, provavelmente porque, ao 8º dia após a lesão, o processo cicatricial ainda não atingiu a fase de maturação do colágeno em ambos os grupos.

5.3 DOS EFEITOS DAS DIETAS SOBRE A CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA

A pele é o maior órgão do organismo e necessita de suprimentos metabólicos constantes para manter sua estrutura e função. Deficiências nutricionais podem levar a alterações associadas à diminuição da integridade da pele e promover maior frequência de feridas cutâneas (PATEL, 2005).

O tratamento das feridas cutâneas complexas (decorrentes de traumas, queimaduras, cirurgias de grande porte e úlceras de pressão) leva

a vultosos custos ao sistema público de saúde. As feridas não cicatrizadas geram problemas socio-econômicos, com diminuição da produtividade e da qualidade de vida dos indivíduos acometidos, o que pode ser agravado pela presença concomitante da desnutrição de macro (energético-proteica) e micronutrientes (STADELMANN *et al.*, 1998).

A presença de desnutrição protéica altera o metabolismo e leva ao prejuízo das funções de reparo tecidual de vários órgãos e tecidos, dentre eles a cicatrização cutânea (PATEL, 2005).

Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado os efeitos benéficos da suplementação da arginina na resistência tênsil e no acúmulo de colágeno de feridas cutâneas (SEIFTER *et al.*, 1978; BARBUL *et al.*, 1985; BARBUL, REGAN, 1990; KIRK *et al.*, 1993; SHI *et al.*, 2000; WITTE, BARBUL, 2002; SHI *et al.*, 2003). O presente estudo demonstra que, a dieta em estudo foi capaz de promover um fechamento mais rápido das lesões cutâneas dorsais (contração das feridas excisionais), uma reepitelização mais eficiente das lesões dorsais, uma maior produção de colágeno total e uma maior força tênsil das áreas cicatrizadas.

Porém não se chegou a conclusões definitivas sobre os benefícios da suplementação pré associada à pós-operatória, não tendo havido diferenças entre os grupos PI e PPI em nenhum dos parâmetros analisados.

Mesmo com grandes avanços científicos no que concerne ao conhecimento sobre a fisiologia de reparação de tecidos e a função das mais variadas substâncias no mecanismo de reparo tecidual, muito ainda precisa ser elucidado.

5.4 PERSPECTIVAS

Algumas questões permanecem não respondidas. Devido ao fato de ainda não se ter estabelecido de forma clara quais são os elementos constituintes da dieta imunomoduladora Impact® mais relacionados às melhoras imunológicas, tornam-se necessários mais estudos controlados

que testem seus componentes em separado. Resta ainda a necessidade de se estudar os efeitos das fórmulas imunomoduladoras, de forma experimental, na presença de desnutrição, ou de estados catabólicos graves como sepse ou trauma grave. Outra necessidade é a de se comprovar o tempo de suplementação pré-operatória necessário e suficiente para alcançar os benefícios pretendidos.

Na prática clínica de um cirurgião plástico, o tratamento dos pacientes portadores de feridas agudas extensas (decorrentes de grandes desenhamentos, por traumas de grande energia ou feridas decorrentes de queimaduras extensas) e principalmente de feridas crônicas (como as úlceras de decúbito) traz grandes dificuldades para o seu manejo. Nestes casos, quaisquer tentativas de procedimentos cirúrgicos visando a cobertura cutânea dos defeitos de pele tende a ser frustra, especialmente se as condições nutricionais do paciente não estiverem satisfatórias. Dessa forma, a comprovação da eficácia de novas terapias nutricionais pode auxiliar em muito o manejo de tais situações clínicas.

Os resultados do presente estudo permitem vislumbrar novas possibilidades de pesquisa na área de nutrição e cicatrização. Entre eles o estudo imunoistoquímico celular e proteico de feridas cutâneas tratadas com dietas enterais suplementadas.

6. CONCLUSÕES

Nas condições da presente pesquisa, em que ratos eutróficos foram suplementados por 7 dias de pré-operatório e por 14 dias de peri-operatório, com a dieta em estudo (Impact®) e foram comparados com ratos também eutróficos suplementados com a dieta controle nos mesmos períodos, pode-se concluir que o uso da dieta em estudo (Impact®) tanto de forma pré como de forma peri-operatória é capaz de promover:

- a) Contração mais rápida de feridas excisionais dorsais, com menores áreas cruentas das mesmas ao final do período de 7 dias de pós-operatório.
- b) Reepitelização mais rápida de feridas cutâneas dorsais ao final do período de 7 dias de pós-operatório.
- c) Maior força tênsil das feridas cutâneas incisionais ventrais, realizada a tensiometria no 8º dia de pós-operatório.
- d) Aceleração da fase de fibroplasia das feridas excisionais dorsais, com maior migração de fibroblastos e maior produção de colágeno total ao final do período de 7 dias de pós-operatório.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-EL-ALEEM, S. A., M. W. FERGUSON, *et al.* Expression of nitric oxide synthase isoforms and arginase in normal human skin and chronic venous leg ulcers. **J Pathol**, v.191, n.4, Aug, p.434-42. 2000.

AGREN, M. S. e L. FRANZEN. Influence of zinc deficiency on breaking strength of 3-week-old skin incisions in the rat. **Acta Chir Scand**, v.156, n.10, Oct, p.667-70. 1990.

AHUMADA, N. G., A. B. BRANCO, *et al.* Influência da dieta enteral suplementada com arginina e antioxidantes sobre parâmetros nutricionais em ratos. **Resumos do 16 EVINVI e 1 EINTI**, p.244. 2008.

ALDERTON, W. K., C. E. COOPER, *et al.* Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J**, v.357, n.Pt 3, Aug 1, p.593-615. 2001.

ALLEN, D. B., J. J. MAGUIRE, *et al.* Wound hypoxia and acidosis limit neutrophil bacterial killing mechanisms. **Arch Surg**, v.132, n.9, Sep, p.991-6. 1997.

ALLENDORF, J. D., M. BESSLER, *et al.* Helium-neon laser irradiation at fluences of 1, 2, and 4 J/cm² failed to accelerate wound healing as assessed by both wound contracture rate and tensile strength. **Lasers Surg Med**, v.20, n.3, p.340-5. 1997.

ALVES, M. **Influência da nicotina, durante a gestação e lactação, na cicatrização da parede abdominal de ratos lactentes: estudo tensiométrico**. Doutorado em Clínica Cirúrgica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

ALVES, M. R. **Influência da nicotina, durante a gestação e lactação, na cicatrização da parede abdominal de ratos lactentes: estudo tensiométrico, morfológico e imunoistoquímico.** Doutorado em Clínica Cirúrgica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

AMIN, H. J., S. A. ZAMORA, *et al.* Arginine supplementation prevents necrotizing enterocolitis in the premature infant. **J Pediatr**, v.140, n.4, Apr, p.425-31. 2002.

BABINEAU, T. J., B. C. BORLASE, *et al.* Applied Total Parenteral Nutrition in the Critically Ill. In: J. M. Rippe, R. S. Irwin, *et al* (Ed.). **Intensive Care Medicine.** Boston: Little, Brown and Co, 1991. Applied Total Parenteral Nutrition in the Critically Ill., p.1675

BALDEZ, R. N., O. MALAFAIA, *et al.* [Healing of colonic anastomosis with the use of extract aqueous of *Orbignya phalerata* (Babassu) in rats]. **Acta Cir Bras**, v.21 Suppl 2, p.31-8. 2006.

BALLANTYNE, G. H. Intestinal suturing. Review of the experimental foundations for traditional doctrines. **Dis Colon Rectum**, v.26, n.12, Dec, p.836-43. 1983.

BARBUL, A. Immune aspects of wound repair. **Clin Plast Surg**, v.17, n.3, Jul, p.433-42. 1990.

BARBUL, A., R. B. DAMEWOOD, *et al.* Fluid and mononuclear cells from healing wounds inhibit thymocyte immune responsiveness. **J Surg Res**, v.34, n.6, Jun, p.505-9. 1983.

BARBUL, A., R. S. FISHEL, *et al.* Inhibition of host immunity by fluid and mononuclear cells from healing wounds. **Surgery**, v.96, n.2, Aug, p.315-20. 1984.

BARBUL, A., R. S. FISHEL, *et al.* Intravenous hyperalimentation with high arginine levels improves wound healing and immune function. **J Surg Res**, v.38, n.4, Apr, p.328-34. 1985.

BARBUL, A. e M. C. REGAN. The regulatory role of T lymphocytes in wound healing. **J Trauma**, v.30, n.12 Suppl, Dec, p.S97-100. 1990.

BARRIENTOS, S., O. STOJADINOVIC, *et al.* Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair Regen**, v.16, n.5, Sep-Oct, p.585-601. 2008.

BAUM, C. L. e C. J. ARPEY. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. **Dermatol Surg**, v.31, n.6, Jun, p.674-86; discussion 686. 2005.

BELL, E., H. P. EHRLICH, *et al.* Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. **Science**, v.211, n.4486, Mar 6, p.1052-4. 1981.

BERNHARDT, J. A. **Influência da desnutrição na cicatrização da anastomose colônica em ratos toxêmicos**. Clínica Cirúrgica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

BEZERRA, J. A., A. C. CAMPOS, *et al.* [Extract of *Passiflora edulis* in the healing of colonic anastomosis in rats: a tensiometric and morphologic study]. **Acta Cir Bras**, v.21 Suppl 3, p.16-25. 2006.

BLOMQUIST, P., H. JIBORN, *et al.* The effect of relative bowel rest on collagen metabolism and suture holding capacity in the colonic wall. Studies in the rat. **Res Exp Med (Berl)**, v.184, n.4, p.221-6. 1984.

BONIN, E. A., A. C. CAMPOS, *et al.* Effect of pantoprazole administered subcutaneously on the healing of sutured gastric incisions in rats. **Eur Surg Res**, v.37, n.4, Jul-Aug, p.250-6. 2005.

BOOTH, B. A., K. L. POLAK, *et al.* Collagen biosynthesis by human skin fibroblasts. I. Optimization of the culture conditions for synthesis of type I and type III procollagens. **Biochim Biophys Acta**, v.607, n.1, Mar 28, p.145-60. 1980.

BOTTONI, A., A. BOTTONI, *et al.* Impact of nutrition support teams on hospitals' nutritional support in the largest South American city and its metropolitan area. **Nutrition**, v.24, n.3, Mar, p.224-32. 2008.

BOUTARD, V., R. HAVOUIIS, *et al.* Transforming growth factor-beta stimulates arginase activity in macrophages. Implications for the regulation of macrophage cytotoxicity. **J Immunol**, v.155, n.4, Aug 15, p.2077-84. 1995.

BRAGA, M., L. GIANOTTI, *et al.* Gut function and immune and inflammatory responses in patients perioperatively fed with supplemented enteral formulas. **Arch Surg**, v.131, n.12, Dec, p.1257-64; discussion 1264-5. 1996.

BRAGA, M., L. GIANOTTI, *et al.* Hospital resources consumed for surgical morbidity: effects of preoperative arginine and omega-3 fatty acid supplementation on costs. **Nutrition**, v.21, n.11-12, Nov-Dec, p.1078-86. 2005.

BROUGHTON, G., 2ND, J. E. JANIS, *et al.* The basic science of wound healing. **Plast Reconstr Surg**, v.117, n.7 Suppl, Jun, p.12S-34S. 2006a.

BROUGHTON, G., 2ND, J. E. JANIS, *et al.* Wound healing: an overview. **Plast Reconstr Surg**, v.117, n.7 Suppl, Jun, p.1e-S-32e-S. 2006b.

BROWN, E. J. Phagocytosis. **Bioessays**, v.17, n.2, Feb, p.109-17. 1995.

CAMPOS, A. C., A. K. GROTH, *et al.* Assessment and nutritional aspects of wound healing. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v.11, n.3, May, p.281-8. 2008.

CANTURK, N. Z., B. VURAL, *et al.* The role of L-arginine and neutrophils on incisional wound healing. **Eur J Emerg Med**, v.8, n.4, Dec, p.311-5. 2001.

CASTILLO, L., M. SANCHEZ, *et al.* Plasma arginine, citrulline, and ornithine kinetics in adults, with observations on nitric oxide synthesis. **Am J Physiol**, v.268, n.2 Pt 1, Feb, p.E360-7. 1995.

CHIBATA, M. **Nicotina subcutânea e cicatrização da parede abdominal em ratos: estudo histológico e tensiométrico.** Mestrado em Clínica Cirúrgica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

CIUBOTARU, D., R. BERGMAN, *et al.* Epidermolysis bullosa simplex in Israel: clinical and genetic features. **Arch Dermatol**, v.139, n.4, Apr, p.498-505. 2003.

CLARK, A. F. Wound Repair. In: (Ed.). **Robbins and Cotran pathologic basis of disease.** Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2005. Wound Repair, p.xv, 1525 p.

CLARK, A. H. Effect of diet on healing of wounds. . **Bull. Johns Hopkins Hosp**, v.30, p.117. 1919.

CLARK, M. A., L. D. PLANK, *et al.* Wound healing associated with severe surgical illness. **World J Surg**, v.24, n.6, Jun, p.648-54. 2000.

CLARK, R. A., J. M. LANIGAN, *et al.* Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. **J Invest Dermatol**, v.79, n.5, Nov, p.264-9. 1982.

COELHO-LEMO, I. C., A. C. CAMPOS, *et al.* In utero malnutrition influences wound healing of newborn rats as measured by tensile strength and collagen deposition. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v.28, n.4, Jul-Aug, p.241-4; discussion 245. 2004.

CORREIA, M. I. e A. C. CAMPOS. Prevalence of hospital malnutrition in Latin America: the multicenter ELAN study. **Nutrition**, v.19, n.10, Oct, p.823-5. 2003.

COSGROVE, M. Perinatal and infant nutrition. Nucleotides. **Nutrition**, v.14, n.10, Oct, p.748-51. 1998.

CROSS, S. E., I. L. NAYLOR, *et al.* An experimental model to investigate the dynamics of wound contraction. **Br J Plast Surg**, v.48, n.4, Jun, p.189-97. 1995.

DA COSTA, M. A., A. C. CAMPOS, *et al.* Oral glutamine and the healing of colonic anastomoses in rats. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v.27, n.3, May-Jun, p.182-5; discussion 185-6. 2003.

DALY, J. M., H. M. VARS, *et al.* Effects of protein depletion on strength of colonic anastomoses. **Surg Gynecol Obstet**, v.134, n.1, Jan, p.15-21. 1972.

DARBY, I., O. SKALLI, *et al.* Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. **Lab Invest**, v.63, n.1, Jul, p.21-9. 1990.

DAVIDSON, J. M. Animal models for wound repair. **Arch Dermatol Res**, v.290 (Suppl), p.S1-S11. 1998.

DE LUIS, D. A., O. IZAOLA, *et al.* Randomized clinical trial with an enteral arginine-enhanced formula in early postsurgical head and neck cancer patients. **Eur J Clin Nutr**, v.58, n.11, Nov, p.1505-8. 2004.

DEBATS, I. B., D. I. BOOI, *et al.* Oral arginine supplementation and the effect on skin graft donor sites: a randomized clinical pilot study. **J Burn Care Res**, v.30, n.3, May-Jun, p.417-26. 2009.

DEGEORGE, G. L., D. E. HECK, *et al.* Arginine metabolism in keratinocytes and macrophages during nitric oxide biosynthesis: multiple modes of action of nitric oxide synthase inhibitors. **Biochem Pharmacol**, v.54, n.1, Jul 1, p.103-12. 1997.

DEMLING, R. H. Nutrition, anabolism, and the wound healing process: an overview. **Eplasty**, v.9, p.e9. 2009.

DEODHAR, A. K. e R. E. RANA. Surgical physiology of wound healing: a review. **J Postgrad Med**, v.43, n.2, Apr-Jun, p.52-6. 1997.

DESMOULIERE, A. [The healing of wounds. Biology and physiopathology]. **Soins**, n.595, Apr, p.5-9. 1995.

DESMOULIERE, A., I. DARBY, *et al.* Extracellular matrix deposition, lysyl oxidase expression, and myofibroblastic differentiation during the initial stages of cholestatic fibrosis in the rat. **Lab Invest**, v.76, n.6, Jun, p.765-78. 1997.

DESNEVES, K. J., B. E. TODOROVIC, *et al.* Treatment with supplementary arginine, vitamin C and zinc in patients with pressure ulcers: a randomised controlled trial. **Clin Nutr**, v.24, n.6, Dec, p.979-87. 2005.

DETMAR, M. The role of VEGF and thrombospondins in skin angiogenesis. **J Dermatol Sci**, v.24 Suppl 1, Dec, p.S78-84. 2000.

DETMAR, M., L. F. BROWN, *et al.* Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. **J Invest Dermatol**, v.108, n.3, Mar, p.263-8. 1997.

DETSKY, A. S., J. P. BAKER, *et al.* Perioperative parenteral nutrition: a meta-analysis. **Ann Intern Med**, v.107, n.2, Aug, p.195-203. 1987.

DEUEL, T. F., R. M. SENIOR, *et al.* Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet-derived growth factor. **J Clin Invest**, v.69, n.4, Apr, p.1046-9. 1982.

DIEGELMANN, R. F. Cellular and biochemical aspects of normal and abnormal wound healing: an overview. **J Urol**, v.157, n.1, Jan, p.298-302. 1997.

DORSETT-MARTIN, W. A. Rat models of skin wound healing: a review. **Wound Repair Regen**, v.12, n.6, Nov-Dec, p.591-9. 2004.

DOVI, J. V., L. K. HE, *et al.* Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. **J Leukoc Biol**, v.73, n.4, Apr, p.448-55. 2003.

DUGGAN, C., J. GANNON, *et al.* Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. **Am J Clin Nutr**, v.75, n.5, May, p.789-808. 2002.

EFRON, D. T., D. MOST, *et al.* A novel method of studying wound healing. **J Surg Res**, v.98, n.1, Jun 1, p.16-20. 2001.

EGOZI, E. I., A. M. FERREIRA, *et al.* Mast cells modulate the inflammatory but not the proliferative response in healing wounds. **Wound Repair Regen**, v.11, n.1, Jan-Feb, p.46-54. 2003.

EHRlich, H. P. e T. M. KRUMMEL. Regulation of wound healing from a connective tissue perspective. **Wound Repair Regen**, v.4, n.2, Apr-Jun, p.203-10. 1996.

ELWYN, D. H., C. W. BRYAN-BROWN, *et al.* Nutritional aspects of body water dislocations in postoperative and depleted patients. **Ann Surg**, v.182, n.1, Jul, p.76-85. 1975.

EMING, S. A., T. KRIEG, *et al.* Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **J Invest Dermatol**, v.127, n.3, Mar, p.514-25. 2007.

EVOY, D., M. D. LIEBERMAN, *et al.* Immunonutrition: the role of arginine. **Nutrition**, v.14, n.7-8, Jul-Aug, p.611-7. 1998.

FARAHANI, R. M. e L. C. KLOTH. The hypothesis of 'biophysical matrix contraction': wound contraction revisited. **Int Wound J**, v.5, n.3, Jun, p.477-82. 2008.

FARHAT, S. M., N. S. AMER, *et al.* Effect of mechlorethamine hydrochloride (nitrogen mustard) on healing of abdominal wounds. **AMA Arch Surg**, v.76, n.5, May, p.749-51; discussion 751-3. 1958.

FERREIRA, M. **Radioterapia pré e pós-operatória na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos avaliada mediante estudo tensiométrico, histológico e da morfometria do colágeno.** Mestrado em Clínica Cirúrgica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

FLAMME, I., T. FROLICH, *et al.* Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. **J Cell Physiol**, v.173, n.2, Nov, p.206-10. 1997.

FOLKMAN, J. Angiogenesis: initiation and control. **Ann N Y Acad Sci**, v.401, p.212-27. 1982.

FOLKMAN, J. Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview. **Exs**, v.79, p.1-8. 1997.

FOLKMAN, J. e P. A. D'AMORE. Blood vessel formation: what is its molecular basis? **Cell**, v.87, n.7, Dec 27, p.1153-5. 1996.

FRANK, S., H. KAMPFER, *et al.* Nitric oxide drives skin repair: novel functions of an established mediator. **Kidney Int**, v.61, n.3, Mar, p.882-8. 2002.

FURST, P. e K. S. KUHN. Fish oil emulsions: what benefits can they bring? **Clin Nutr**, v.19, n.1, Feb, p.7-14. 2000.

GALIANO, R. D., J. T. MICHAELS, *et al.* Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. **Wound Repair Regen**, v.12, n.4, Jul-Aug, p.485-92. 2004.

GIANOTTI, L., M. BRAGA, *et al.* A randomized controlled trial of preoperative oral supplementation with a specialized diet in patients with gastrointestinal cancer. **Gastroenterology**, v.122, n.7, Jun, p.1763-70. 2002.

GIANOTTI, L., M. BRAGA, *et al.* Lack of improvement of prognostic performance of weight loss when combined with other parameters. **Nutrition**, v.11, n.1, Jan-Feb, p.12-6. 1995.

GILLITZER, R. e M. GOEBELER. Chemokines in cutaneous wound healing. **J Leukoc Biol**, v.69, n.4, Apr, p.513-21. 2001.

GILMAN, A. G., M. I. SIMON, *et al.* Overview of the Alliance for Cellular Signaling. **Nature**, v.420, n.6916, Dec 12, p.703-6. 2002.

GOLIGER, J. A. e D. L. PAUL. Wounding alters epidermal connexin expression and gap junction-mediated intercellular communication. **Mol Biol Cell**, v.6, n.11, Nov, p.1491-501. 1995.

GOMES, C. S., A. C. CAMPOS, *et al.* [Passiflora edulis extract and the healing of abdominal wall of rats: morphological and tensiometric study]. **Acta Cir Bras**, v.21 Suppl 2, p.9-16. 2006.

GONCALVES, C. G., A. K. GROTH, *et al.* Influence of preoperative feeding on the healing of colonic anastomoses in malnourished rats. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v.33, n.1, Jan-Feb, p.83-9. 2009.

GOODSON, W. H., 3RD. Application of expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) tubing to the study of human wound healing. **J Biomater Appl**, v.2, n.1, Jul, p.101-17. 1987.

GOTTRUP, F., M. S. AGREN, *et al.* Models for use in wound healing research: a survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue. **Wound Repair Regen**, v.8, n.2, Mar-Apr, p.83-96. 2000.

GRAY, A. J., J. E. BISHOP, *et al.* A alpha and B beta chains of fibrinogen stimulate proliferation of human fibroblasts. **J Cell Sci**, v.104 (Pt 2), Feb, p.409-13. 1993.

GUO, N., H. C. KRUTZSCH, *et al.* Thrombospondin 1 and type I repeat peptides of thrombospondin 1 specifically induce apoptosis of endothelial cells. **Cancer Res**, v.57, n.9, May 1, p.1735-42. 1997.

GURTNER, G. C., S. WERNER, *et al.* Wound repair and regeneration. **Nature**, v.453, n.7193, May 15, p.314-21. 2008.

HARDY, G., A. M. MENENDEZ, *et al.* Trace element supplementation in parenteral nutrition: pharmacy, posology, and monitoring guidance. **Nutrition**, v.25, n.11-12, Nov-Dec, p.1073-84. 2009.

HARVEY, S. C. e E. L. HOWES. Effect of High Protein Diet on the Velocity of Growth of Fibroblasts in the Healing Wound. **Ann Surg**, v.91, n.5, May, p.641-50. 1930.

HAYDOCK, D. A., M. H. FLINT, *et al.* The efficacy of subcutaneous goretex implants in monitoring wound healing response in experimental protein deficiency. **Connect Tissue Res**, v.17, n.3, p.159-69. 1988.

HAYDOCK, D. A. e G. L. HILL. Impaired wound healing in surgical patients with varying degrees of malnutrition. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v.10, n.6, Nov-Dec, p.550-4. 1986.

HENDRIKS, T. e W. J. MASTBOOM. Healing of experimental intestinal anastomoses. Parameters for repair. **Dis Colon Rectum**, v.33, n.10, Oct, p.891-901. 1990.

HEYLAND, D. K., D. J. COOK, *et al.* Does the formulation of enteral feeding products influence infectious morbidity and mortality rates in the critically ill patients? A critical review of the evidence. **Crit Care Med**, v.22, n.7, Jul, p.1192-202. 1994.

HINCK, A. P., S. J. ARCHER, *et al.* Transforming growth factor beta 1: three-dimensional structure in solution and comparison with the X-ray structure of transforming growth factor beta 2. **Biochemistry**, v.35, n.26, Jul 2, p.8517-34. 1996.

HINZ, B., D. MASTRANGELO, *et al.* Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. **Am J Pathol**, v.159, n.3, Sep, p.1009-20. 2001.

HOSGOOD, G. Wound healing. The role of platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta. **Vet Surg**, v.22, n.6, Nov-Dec, p.490-5. 1993.

HOWES, E. L., J. W. SOOY, *et al.* The healing of wounds as determined by their tensile strength. **JAMA**, v.92, n.1, p.42-45. 1929.

IGARASHI, K. e K. KASHIWAGI. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. **Biochem Biophys Res Commun**, v.271, n.3, May 19, p.559-64. 2000.

IKEUCHI, D., H. ONODERA, *et al.* Correlation of tensile strength with bursting pressure in the evaluation of intestinal anastomosis. **Dig Surg**, v.16, n.6, p.478-85. 1999.

ILAN, N., S. MAHOOTI, *et al.* Distinct signal transduction pathways are utilized during the tube formation and survival phases of in vitro angiogenesis. **J Cell Sci**, v.111 (Pt 24), Dec 18, p.3621-31. 1998.

JONES, N. E. e D. K. HEYLAND. Implementing nutrition guidelines in the critical care setting: a worthwhile and achievable goal? **Jama**, v.300, n.23, Dec 17, p.2798-9. 2008a.

JONES, N. E. e D. K. HEYLAND. Pharmaconutrition: a new emerging paradigm. **Curr Opin Gastroenterol**, v.24, n.2, Mar, p.215-22. 2008b.

JONSSON, K., H. JIBORN, *et al.* Breaking strength of small intestinal anastomoses. **Am J Surg**, v.145, n.6, Jun, p.800-3. 1983.

JORGENSEN, P. H. Growth hormone, skin and wound healing--experimental studies in the rat. **APMIS Suppl**, v.72, p.1-54. 1997.

JUNQUEIRA, L. C., W. COSSERMELLI, *et al.* Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. **Arch Histol Jpn**, v.41, n.3, Jun, p.267-74. 1978.

KALEBIC, T., S. GARBISA, *et al.* Basement membrane collagen: degradation by migrating endothelial cells. **Science**, v.221, n.4607, Jul 15, p.281-3. 1983.

KARAHASANOGLU, T., E. ALTINLI, *et al.* Effect of growth hormone treatment on the healing of left colonic anastomoses in protein-malnourished rats. **Br J Surg**, v.85, n.7, Jul, p.931-3. 1998.

KATZ, M. H., A. F. ALVAREZ, *et al.* Human wound fluid from acute wounds stimulates fibroblast and endothelial cell growth. **J Am Acad Dermatol**, v.25, n.6 Pt 1, Dec, p.1054-8. 1991.

KAVITHA, O. e R. V. THAMPAN. Factors influencing collagen biosynthesis. **J Cell Biochem**, v.104, n.4, Jul 1, p.1150-60. 2008.

KEMEN, M., M. SENKAL, *et al.* Early postoperative enteral nutrition with arginine-omega-3 fatty acids and ribonucleic acid-supplemented diet versus placebo in cancer patients: an immunologic evaluation of Impact. **Crit Care Med**, v.23, n.4, Apr, p.652-9. 1995.

KINNEY, J. M. e C. WEISSMAN. Forms of malnutrition in stressed and unstressed patients. **Clin Chest Med**, v.7, n.1, Mar, p.19-28. 1986.

KIRK, S. J., M. HURSON, *et al.* Arginine stimulates wound healing and immune function in elderly human beings. **Surgery**, v.114, n.2, Aug, p.155-9; discussion 160. 1993.

KIRSNER, R. S. e W. H. EAGLSTEIN. The wound healing process. **Dermatol Clin**, v.11, n.4, Oct, p.629-40. 1993.

KIRSNER, R. S., V. FALANGA, *et al.* The biology of skin grafts. Skin grafts as pharmacologic agents. **Arch Dermatol**, v.129, n.4, Apr, p.481-3. 1993.

KIYAMA, T., M. B. WITTE, *et al.* The route of nutrition support affects the early phase of wound healing. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v.22, n.5, Sep-Oct, p.276-9. 1998.

KLEIN, S., J. KINNEY, *et al.* Nutrition support in clinical practice: review of published data and recommendations for future research directions. Summary of a conference sponsored by the National Institutes of Health, American Society for Parenteral and Enteral Nutrition, and American Society for Clinical Nutrition. **Am J Clin Nutr**, v.66, n.3, Sep, p.683-706. 1997.

KUNKEL, S. L., T. STANDIFORD, *et al.* Stimulus specific induction of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) gene expression. **Adv Exp Med Biol**, v.305, p.65-71. 1991.

LANGKAMP-HENKEN, B., L. R. JOHNSON, *et al.* Differential effect on polyamine metabolism in mitogen- and superantigen-activated human T-cells. **Biochim Biophys Acta**, v.1425, n.2, Oct 23, p.337-47. 1998.

LAPLANTE, A. F., L. GERMAIN, *et al.* Mechanisms of wound reepithelialization: hints from a tissue-engineered reconstructed skin to long-standing questions. **Faseb J**, v.15, n.13, Nov, p.2377-89. 2001.

LAW, D. K., S. J. DUDRICK, *et al.* Immunocompetence of patients with protein-calorie malnutrition. The effects of nutritional repletion. **Ann Intern Med**, v.79, n.4, Oct, p.545-50. 1973.

LAWRENCE, W. T. e R. F. DIEGELMANN. Growth factors in wound healing. **Clin Dermatol**, v.12, n.1, Jan-Mar, p.157-69. 1994.

LEIBOVICH, S. J. e R. ROSS. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. **Am J Pathol**, v.78, n.1, Jan, p.71-100. 1975.

LELEIKO, N. S. e M. J. WALSH. Dietary purine nucleotides and the gastrointestinal tract. **Nutrition**, v.11, n.6, Nov-Dec, p.725-30. 1995.

LI, J., J. CHEN, *et al.* Pathophysiology of acute wound healing. **Clin Dermatol**, v.25, n.1, Jan-Feb, p.9-18. 2007.

LI, J., Y. P. ZHANG, *et al.* Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. **Microsc Res Tech**, v.60, n.1, Jan 1, p.107-14. 2003.

LI, J., L. ZHOU, *et al.* Overexpression of laminin-8 in human dermal microvascular endothelial cells promotes angiogenesis-related functions. **J Invest Dermatol**, v.126, n.2, Feb, p.432-40. 2006.

LINDBLAD, W. J. Animal models in wound healing research: do we need more? **Wound Repair Regen**, v.8, n.2, Mar-Apr, p.81-2. 2000.

LIU, W., B. J. MEHRARA, *et al.* The use of newborn rats and an adenoviral gene delivery vector as a model system for wound-healing research. **Ann Plast Surg**, v.44, n.5, May, p.543-51; discussion 551-2. 2000.

LONGAKER, M. T., Z. M. PELED, *et al.* Fetal wound healing: progress report and future directions. **Surgery**, v.130, n.5, Nov, p.785-7. 2001.

LORENA, D., K. UCHIO, *et al.* Normal scarring: importance of myofibroblasts. **Wound Repair Regen**, v.10, n.2, Mar-Apr, p.86-92. 2002.

MADLENER, M., W. C. PARKS, *et al.* Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair. **Exp Cell Res**, v.242, n.1, Jul 10, p.201-10. 1998.

MAEHIRA, F., G. A. LUYO, *et al.* Alterations of serum selenium concentrations in the acute phase of pathological conditions. **Clin Chim Acta**, v.316, n.1-2, Feb, p.137-46. 2002.

MAINOUS, M. R., E. F. BLOCK, *et al.* Nutritional support of the gut: how and why. **New Horiz**, v.2, n.2, May, p.193-201. 1994.

MAINOUS, M. R. e E. A. DEITCH. Nutrition and infection. **Surg Clin North Am**, v.74, n.3, Jun, p.659-76. 1994.

MARTIN, P. e S. J. LEIBOVICH. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends Cell Biol**, v.15, n.11, Nov, p.599-607. 2005.

MATHES, S. J. e V. R. HENTZ. **Plastic surgery**. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier. 2006

MCCOWEN, K. C. e B. R. BISTRIAN. Immunonutrition: problematic or problem solving? **Am J Clin Nutr**, v.77, n.4, Apr, p.764-70. 2003.

MCDANIEL, J. C., M. BELURY, *et al.* Omega-3 fatty acids effect on wound healing. **Wound Repair Regen**, v.16, n.3, May-Jun, p.337-45. 2008.

MCGOWAN, K. A. e M. P. MARINKOVICH. Laminins and human disease. **Microsc Res Tech**, v.51, n.3, Nov 1, p.262-79. 2000.

MCGRATH, M. H. e R. H. SIMON. Wound geometry and the kinetics of wound contraction. **Plast Reconstr Surg**, v.72, n.1, Jul, p.66-73. 1983.

MILLER, E. J. e S. GAY. Collagen: an overview. **Methods Enzymol**, v.82 Pt A, p.3-32. 1982.

MILLS, C. D. Macrophage arginine metabolism to ornithine/urea or nitric oxide/citrulline: a life or death issue. **Crit Rev Immunol**, v.21, n.5, p.399-425. 2001.

MOREIRA, J. C. M. Desnutrição e Cicatrização de Feridas. In: D. L. Waitzberg (Ed.). **Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica**. São Paulo: Atheneu, 2000. Desnutrição e Cicatrização de Feridas, p.411-21

NANNEY, L. B., J. P. SUNDBERG, *et al.* Increased epidermal growth factor receptor in fsn/fsn mice. **J Invest Dermatol**, v.106, n.6, Jun, p.1169-74. 1996.

NARESSE, L. E., E. F. MENDES, *et al.* Aparelho para medida da força de ruptura das anastomoses intestinais. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo.**, v.42, n.5, p.204-208. 1987.

NEWSHOLME, E. e G. HARDY. Supplementation of diets with nutritional pharmaceuticals. **Nutrition**, v.13, n.9, Sep, p.837-9. 1997.

NGUYEN, B. P., M. C. RYAN, *et al.* Deposition of laminin 5 in epidermal wounds regulates integrin signaling and adhesion. **Curr Opin Cell Biol**, v.12, n.5, Oct, p.554-62. 2000.

NISSEN, N. N., P. J. POLVERINI, *et al.* Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. **Am J Pathol**, v.152, n.6, Jun, p.1445-52. 1998.

NOLI, C. e A. MIOLO. The mast cell in wound healing. **Vet Dermatol**, v.12, n.6, Dec, p.303-13. 2001.

NURDEN, A. T., P. NURDEN, *et al.* Platelets and wound healing. **Front Biosci**, v.13, p.3532-48. 2008.

O'LEARY, M. J. e J. H. COAKLEY. Nutrition and immunonutrition. **Br J Anaesth**, v.77, n.1, Jul, p.118-27. 1996.

PACE, D., A. C. L. CAMPOS, *et al.* Effect of antioxidants (vitamin C, vitamin E and Ginkgo biloba) on the viability of dorsal skin flaps in rats. **Rev Soc Brasil Cir Plast**, v.21, p.77-81. 2006.

PARKS, W. C. Matrix metalloproteinases in repair. **Wound Repair Regen**, v.7, n.6, Nov-Dec, p.423-32. 1999.

PATEL, G. K. The role of nutrition in the management of lower extremity wounds. **Int J Low Extrem Wounds**, v.4, n.1, Mar, p.12-22. 2005.

PEREIRA, C. C. A. **Influência da dieta enteral suplementada com arginina e antioxidantes sobre a cicatrização cutânea experimental.** Doutorado em Ciências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

PHILLIPS, S. J. Physiology of wound healing and surgical wound care. **Asaio J**, v.46, n.6, Nov-Dec, p.S2-5. 2000.

PONTES-ARRUDA, A., A. M. ARAGAO, *et al.* Effects of enteral feeding with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants in mechanically ventilated patients with severe sepsis and septic shock. **Crit Care Med**, v.34, n.9, Sep, p.2325-33. 2006.

PONTES-ARRUDA, A., S. DEMICHELE, *et al.* The use of an inflammation-modulating diet in patients with acute lung injury or acute respiratory distress syndrome: a meta-analysis of outcome data. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v.32, n.6, Nov-Dec, p.596-605. 2008.

POSTLETHWAITE, A. E. e A. H. KANG. Guinea pig lymphocyte-derived macrophage aggregation factor: its separation from macrophage migration inhibitory factor. **J Immunol**, v.117, n.5 Pt 1, Nov, p.1651-5. 1976.

RABAU, M., A. EYAL, *et al.* Bursting pressure in anastomotic healing in experimentally induced colitis in rats. **Dis Colon Rectum**, v.41, n.4, Apr, p.468-72. 1998.

RADY, M. Y., T. RYAN, *et al.* Clinical characteristics of preoperative hypoalbuminemia predict outcome of cardiovascular surgery. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v.21, n.2, Mar-Apr, p.81-90. 1997.

RISO, S., P. ALUFFI, *et al.* Postoperative enteral immunonutrition in head and neck cancer patients. **Clin Nutr**, v.19, n.6, Dec, p.407-12. 2000.

ROBERFROID, M. B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? **Am J Clin Nutr**, v.71, n.6 Suppl, Jun, p.1682S-7S; discussion 1688S-90S. 2000.

ROBERTS, P. R., K. W. BLACK, *et al.* Dietary peptides improve wound healing following surgery. **Nutrition**, v.14, n.3, Mar, p.266-9. 1998.

ROBSON, M. C., D. L. STEED, *et al.* Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. **Curr Probl Surg**, v.38, n.2, Feb, p.72-140. 2001.

RUTHIG, D. J. e K. A. MECKLING-GILL. Both (n-3) and (n-6) fatty acids stimulate wound healing in the rat intestinal epithelial cell line, IEC-6. **J Nutr**, v.129, n.10, Oct, p.1791-8. 1999.

SANTOS, J. I. Nutrition, infection, and immunocompetence. **Infect Dis Clin North Am**, v.8, n.1, Mar, p.243-67. 1994.

SANTOS, O. J., J. M. RIBAS FILHO, *et al.* [Evaluation of aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) extract on the healing process of gastrotomy in rats]. **Acta Cir Bras**, v.21 Supl 2, p.39-45. 2006.

SAPIRSTEIN, A. e J. V. BONVENTRE. Specific physiological roles of cytosolic phospholipase A(2) as defined by gene knockouts. **Biochim Biophys Acta**, v.1488, n.1-2, Oct 31, p.139-48. 2000.

SAVASSI-ROCHA, P. R. e R. L. C. LOPES. Anastomoses intestinais: bases da cicatrização e análise dos diferentes tipos. **Tópicos em Gastroenterologia**, v.5, p.493-521. 1994.

SCHAFFER, M. R., U. TANTRY, *et al.* Inhibition of nitric oxide synthesis in wounds: pharmacology and effect on accumulation of collagen in wounds in mice. **Eur J Surg**, v.165, n.3, Mar, p.262-7. 1999.

SCHIRO, J. A., B. M. CHAN, *et al.* Integrin alpha 2 beta 1 (VLA-2) mediates reorganization and contraction of collagen matrices by human cells. **Cell**, v.67, n.2, Oct 18, p.403-10. 1991.

SCHMIDT, B. Z. e H. R. COLTEN. Complement: a critical test of its biological importance. **Immunol Rev**, v.178, Dec, p.166-76. 2000.

SCHMITZ, L. D. **Nutrição perioperatória suplementada com glutamina em ratos desnutridos submetidos à anastomose colônica: avaliação morfológica e tensiométrica.** Mestrado em Clínica Cirúrgica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

SCHOLL, D. e B. LANGKAMP-HENKEN. Nutrient recommendations for wound healing. **J Intraven Nurs**, v.24, n.2, Mar-Apr, p.124-32. 2001.

SEIFTER, E., G. RETTURA, *et al.* Arginine: an essential amino acid for injured rats. **Surgery**, v.84, n.2, Aug, p.224-30. 1978.

SETHI, K. K., V. MUDERA, *et al.* Contraction-mediated pinocytosis of RGD-peptide by dermal fibroblasts: inhibition of matrix attachment blocks contraction and disrupts microfilament organisation. **Cell Motil Cytoskeleton**, v.52, n.4, Aug, p.231-41. 2002.

SHERRY, B., P. TEKAMP-OLSON, *et al.* Resolution of the two components of macrophage inflammatory protein 1, and cloning and characterization of one of those components, macrophage inflammatory protein 1 beta. **J Exp Med**, v.168, n.6, Dec 1, p.2251-9. 1988.

SHI, H. P., D. T. EFRON, *et al.* Supplemental dietary arginine enhances wound healing in normal but not inducible nitric oxide synthase knockout mice. **Surgery**, v.128, n.2, Aug, p.374-8. 2000.

SHI, H. P., R. S. FISHEL, *et al.* Effect of supplemental ornithine on wound healing. **J Surg Res**, v.106, n.2, Aug, p.299-302. 2002.

SHI, H. P., D. MOST, *et al.* Supplemental L-arginine enhances wound healing in diabetic rats. **Wound Repair Regen**, v.11, n.3, May-Jun, p.198-203. 2003.

SHI, H. P., S. M. WANG, *et al.* Supplemental L-arginine enhances wound healing following trauma/hemorrhagic shock. **Wound Repair Regen**, v.15, n.1, Jan-Feb, p.66-70. 2007.

SINGER, A. J. e R. A. CLARK. Cutaneous wound healing. **N Engl J Med**, v.341, n.10, Sep 2, p.738-46. 1999.

SISSON, R., S. LANG, *et al.* Comparison of wound healing in various nutritional deficiency states. **Surgery**, v.44, n.4, Oct, p.613-8. 1958.

SKINOVSKI, J. A. **A influência da nicotina na cicatrização de anastomoses do intestino delgado em ratos: angiogênese e miofibroblastos**. Doutorado em Clínica Cirúrgica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.

SOARES, E. W. S., A. C. L. CAMPOS, *et al.* Influência da quimioterapia pós-operatória com 5-fluorouracil na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. **ABCD - Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v.15, n.1, p.31-35. 2002.

SRIRAM, K. e V. A. LONCHYNA. Micronutrient supplementation in adult nutrition therapy: practical considerations. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v.33, n.5, Sep-Oct, p.548-62. 2009.

STADELMANN, W. K., A. G. DIGENIS, *et al.* Impediments to wound healing. **Am J Surg**, v.176, n.2A Suppl, Aug, p.39S-47S. 1998.

STECHMILLER, J. K., B. CHILDRESS, *et al.* Arginine supplementation and wound healing. **Nutr Clin Pract**, v.20, n.1, Feb, p.52-61. 2005.

STEINBRECH, D. S., M. T. LONGAKER, *et al.* Fibroblast response to hypoxia: the relationship between angiogenesis and matrix regulation. **J Surg Res**, v.84, n.2, Jun 15, p.127-33. 1999.

SUCHNER, U., K. S. KUHN, *et al.* The scientific basis of immunonutrition. **Proc Nutr Soc**, v.59, n.4, Nov, p.553-63. 2000.

SWEAT, F., H. PUCHTLER, *et al.* Sirius Red F3ba as a Stain for Connective Tissue. **Arch Pathol**, v.78, Jul, p.69-72. 1964.

SZPADERSKA, A. M., E. I. EGOZI, *et al.* The effect of thrombocytopenia on dermal wound healing. **J Invest Dermatol**, v.120, n.6, Jun, p.1130-7. 2003.

THORNTON, F. J., M. R. SCHAFFER, *et al.* Wound healing in sepsis and trauma. **Shock**, v.8, n.6, Dec, p.391-401. 1997.

TODD, S. R., E. A. GONZALEZ, *et al.* Update on postinjury nutrition. **Curr Opin Crit Care**, v.14, n.6, Dec, p.690-5. 2008.

TOLAZZI, A. R., K. D. TOLAZZI, *et al.* Influence of leukotriene inhibitor montelukast on wound contraction and cutaneous healing process in rats. **Aesthetic Plast Surg**, v.33, n.1, Jan, p.84-9. 2009.

TORRES, L. F. B., B. G. SLUMINSKI, *et al.* Contribuição da imunoistoquímica em patologia cirúrgica: experiência de 10 anos. **Rev Med Paraná**, v.56, n.2, p.31-38. 1998.

TRUBIAN, P. S. **Octreotide subcutâneo e cicatrização de sutura gástrica em ratos: estudo tensiométrico e da morfometria do colágeno**. Mestrado em Clínica Cirúrgica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

UITTO, J., B. A. BOOTH, *et al.* Collagen biosynthesis by human skin fibroblasts. II. Isolation and further characterization of type I and type III procollagens synthesized in culture. **Biochim Biophys Acta**, v.624, n.2, Aug 21, p.545-61. 1980.

URDINALES, A. I. A. **Octreotide na cicatrização de anastomoses colônicas de ratos**. Mestrado em Clínica Cirúrgica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

VAN BUREN, C. T., A. D. KULKARNI, *et al.* The role of nucleotides in adult nutrition. **J Nutr**, v.124, n.1 Suppl, Jan, p.160S-164S. 1994.

VISSE, R. e H. NAGASE. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ Res**, v.92, n.8, May 2, p.827-39. 2003.

VIZZOTO, J. R., L. NORONHA, *et al.* Influência da cisplatina administrada no pré e no pós-operatório sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. **J Bras Patol Med Lab**, v.39, n.2, p.143-149. 2003.

WAITZBERG, D. L., W. T. CAIAFFA, *et al.* Hospital malnutrition: the Brazilian national survey (IBRANUTRI): a study of 4000 patients. **Nutrition**, v.17, n.7-8, Jul-Aug, p.573-80. 2001.

WAITZBERG, D. L., H. SAITO, *et al.* Postsurgical infections are reduced with specialized nutrition support. **World J Surg**, v.30, n.8, Aug, p.1592-604. 2006.

WAITZBERG, D. L. e R. S. TORRINHAS. Fish oil lipid emulsions and immune response: what clinicians need to know. **Nutr Clin Pract**, v.24, n.4, Aug-Sep, p.487-99. 2009.

WELCH, M. P., G. F. ODLAND, *et al.* Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction. **J Cell Biol**, v.110, n.1, Jan, p.133-45. 1990.

WELLER, K., K. FOITZIK, *et al.* Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. **Faseb J**, v.20, n.13, Nov, p.2366-8. 2006.

WERNER, B. **Indicações e contribuição diagnóstica da imunoistoquímica em patologia cirúrgica**. Mestrado em Clínica Cirúrgica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

WERNER, S., H. SMOLA, *et al.* The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. **Science**, v.266, n.5186, Nov 4, p.819-22. 1994.

WESTERMARK, K., M. LUNDQVIST, *et al.* EGF-receptors in human normal and pathological thyroid tissue. **Histopathology**, v.28, n.3, Mar, p.221-7. 1996.

WILGUS, T. A. Immune cells in the healing skin wound: influential players at each stage of repair. **Pharmacol Res**, v.58, n.2, Aug, p.112-6. 2008.

WILLIAMS, J. Z., N. ABUMRAD, *et al.* Effect of a specialized amino acid mixture on human collagen deposition. **Ann Surg**, v.236, n.3, Sep, p.369-74; discussion 374-5. 2002.

WITTE, M. B. e A. BARBUL. General principles of wound healing. **Surg Clin North Am**, v.77, n.3, Jun, p.509-28. 1997.

WITTE, M. B. e A. BARBUL. Role of nitric oxide in wound repair. **Am J Surg**, v.183, n.4, Apr, p.406-12. 2002.

WITTE, M. B. e A. BARBUL. Arginine physiology and its implication for wound healing. **Wound Repair Regen**, v.11, n.6, Nov-Dec, p.419-23. 2003a.

WITTE, M. B. e A. BARBUL. Repair of full-thickness bowel injury. **Crit Care Med**, v.31, n.8 Suppl, Aug, p.S538-46. 2003b.

WITTE, M. B., F. J. THORNTON, *et al.* L-Arginine supplementation enhances diabetic wound healing: involvement of the nitric oxide synthase and arginase pathways. **Metabolism**, v.51, n.10, Oct, p.1269-73. 2002.

WOODLEY, D. T., E. J. O'KEEFE, *et al.* Cutaneous wound healing: a model for cell-matrix interactions. **J Am Acad Dermatol**, v.12, n.2 Pt 2, Feb, p.420-33. 1985.

WU, G. Intestinal mucosal amino acid catabolism. **J Nutr**, v.128, n.8, Aug, p.1249-52. 1998.

WU, G., N. E. FLYNN, *et al.* Dietary protein or arginine deficiency impairs constitutive and inducible nitric oxide synthesis by young rats. **J Nutr**, v.129, n.7, Jul, p.1347-54. 1999.

WU, G. H., Y. W. ZHANG, *et al.* Modulation of postoperative immune and inflammatory response by immune-enhancing enteral diet in gastrointestinal cancer patients. **World J Gastroenterol**, v.7, n.3, Jun, p.357-62. 2001.

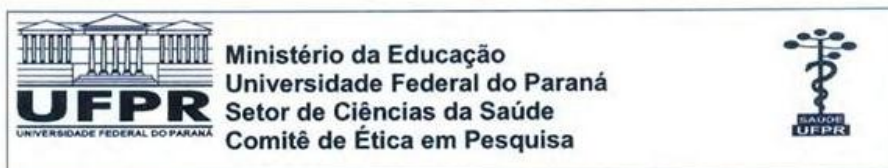
XU, J. e R. A. CLARK. Extracellular matrix alters PDGF regulation of fibroblast integrins. **J Cell Biol**, v.132, n.1-2, Jan, p.239-49. 1996.

YARON, M., M. H. ERIN, *et al.* Efficacy of tissue glue for laceration repair in an animal model. **Acad Emerg Med**, v.2, n.4, Apr, p.259-63. 1995.

ZALOGA, G. P., R. SIDDIQUI, *et al.* Arginine: mediator or modulator of sepsis? **Nutr Clin Pract**, v.19, n.3, Jun, p.201-15. 2004.

ZHANG, K., M. D. REKHTER, *et al.* Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and in situ hybridization study. **Am J Pathol**, v.145, n.1, Jul, p.114-25. 1994.

8. ANEXOS



Curitiba, 07 de julho de 2008.

Ilmo (a) Sr. (a)
Antonio Carlos Ligocki Campos
Nicolas Galat Ahumada
Nesta

Prezado(a) Pesquisador(a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Influência da suplementação da dieta enteral padrão com arginina e antioxidantes sobre a cicatrização (colônica, epitelial) de ratos"** está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 26 de março de 2008 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 04 de julho de 2008.

Registro **CEP/SD**: AN.011.002.08.03

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do relatório final ou parcial: 04/01/2008.

Atenciosamente



Prof.ª. Dr.ª. Liliana Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

Prof.ª. Dra. Liliana Maria Labronici
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa - SD/UFPR